



# Implication de l'Insulin-like Growth Factor (IGF-I), secrété par le microenvironnement tumoral, dans la survie et la chimiorésistance des cellules cancéreuses

Nadia Benabbou

## ► To cite this version:

Nadia Benabbou. Implication de l'Insulin-like Growth Factor (IGF-I), secrété par le microenvironnement tumoral, dans la survie et la chimiorésistance des cellules cancéreuses. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA11T100 . tel-00921852

**HAL Id: tel-00921852**

**<https://theses.hal.science/tel-00921852>**

Submitted on 18 Apr 2014

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSITE PARIS XI  
FACULTE DE MEDECINE PARIS-SUD**

**THESE**

Pour obtenir le grade de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS XI**

Spécialité Cancérologie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Ecole Doctorale de Rattachement : Cancérologie Santé

Présentée et soutenue publiquement

Par

**BENABBOU NADIA**

Le 21 Décembre 2012

**TITRE**

**Implication de l'Insulin-like Growth Factor (IGF-I), secrété par le  
microenvironnement tumoral, dans la survie et la chimiorésistance des cellules  
cancéreuses**

**Jury**

Président	<b>Professeur Christian Auclair</b>
Rapporteur	<b>Docteur Laurent Garderet</b>
Rapporteur	<b>Docteur Rémi Varin</b>
Examineur	<b>Professeur Claudine Botteri</b>
Examineur	<b>Docteur Lu He</b>
Directeur de thèse	<b>Docteur Massoud Mirshah</b>

## Résumé

Le microenvironnement, composé de différents éléments cellulaires et de la matrice extracellulaire, joue un rôle primordial dans le développement tumoral et la dissémination métastatique. Ainsi, l'étude de ces interactions cellulaires est importante pour que des thérapies ciblées luttent contre la chimiorésistance des cellules tumorales. Ce travail de thèse a pour but d'étudier le rôle du facteur de croissance IGF-I dans la chimiorésistance des cellules du cancer de l'ovaire et des leucémies myéloïdes présente au sein du microenvironnement.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence que la chimiorésistance des cellules du cancer de l'ovaire, acquise grâce aux cellules hôtes (hospicells), est liée à la sécrétion de IGF-I par ces cellules. Nous avons également montré que IGF-I est impliqué dans la régulation de certains gènes ABC (*MDR-1*, *MRP1*, *MRP2*, et *BCRP*) via les voies de *STAT3*, *Jak2*, *PI3K* et *ERK*.

Dans les leucémies myéloïdes, nous avons montré que IGF-I a un effet sur la prolifération des cellules tumorales. Il induit l'expression de la protéine P-gp ainsi que la chimiorésistance des cellules sensibles à la chimiothérapie. Nous avons également déterminé le rôle de IGF-I dans la résistance des cellules leucémiques en présence des hospicells. Ces dernières ont une activité hyperangiogénique *in vivo*, lié à l'*HIF-1* et au *VEGF*, et inhibent les réponses immunes des lymphocytes T par production de *NO*.

Nous avons déterminé le rôle crucial de *MMP-9* dans la migration des cellules résistantes du cancer du sein exprimant la protéine P-gp et dans la formation d'un réseau tubulaire, suggérant un lien existant entre l'expression de P-gp et de *MMP-9*.

Mot clés : Chimiorésistance, hospicells, leucémie, cancer de l'ovaire, protéines ABC

## Abstract

The microenvironment, composed of several cellular elements and extracellular matrix, plays an important role in tumor development and metastasis. Thus, the study of these interactions is important for cell targeted therapies fighting against chemoresistant tumor cells. This thesis aims to investigate the role of growth factor IGF-I in the chemoresistance of ovarian cancer cells and myeloid leukemia, present in the microenvironment.

As a first step, we demonstrated that drug resistance of ovarian cancer cells gained by host cells (hospicells) is related to the secretion of IGF-I by these cells. We have also demonstrated that IGF-I is involved in the regulation of genes ABC (*MDR-1*, *MRP1*, *MRP2*, and *BCRP*) via *STAT3*, *Jak2*, *PI3K* et *ERK* signaling pathways.

In myeloid leukemia, we have shown that IGF-I has an effect on cell proliferation. It induces the expression of P-gp protein and chemoresistance of cells sensitive to chemotherapy. We also determined the role of IGF-I in the resistance of leukemic cells in the presence of hospicells. These cells have an *in vivo* hyperangiogenic activity, related to *HIF-1* and *VEGF*, and inhibit immune responses of T cells by *NO* production.

We determined the crucial role of *MMP-9* in resistant cells migration of breast cancer expressing P-gp protein and in the formation of a tubular network, suggesting a link between the expression of P-gp and *MMP-9*.

Keywords: Chemoresistance hospicells, leukemia, ovarian cancer, ABC proteins

## Remerciements

*A la mémoire de mon père Lahouari,*

*A ma mère Naima,*

Pour avoir éveillé et encouragé ma curiosité et m'avoir toujours poussé à donner le meilleur de moi-même

*A Stéphane,*

Pour avoir supporté mes humeurs (souvent dans les deux sens du terme)

Pour ta patience et ton indulgence, les « j'arrive, j'arrive tout de suite » qui souvent se prolongent et le travail en week-end

Ta présence à mes côtés a été d'un grand soutien

J'espère pouvoir te rendre un jour tout ce que tu m'as donné

*A toute ma famille,*

Ali, pour m'avoir encouragée ces deux dernières années et pour m'avoir achetée souvent des pizzas

Samira, Faiza, Djamel, Amel, le petit houari, qui m'ont en toutes occasions apporté les moyens et le soutien sans limite nécessaires à l'accomplissement de ce long parcours d'études supérieures

*A ma belle famille,*

Geneviève, Paul, Angélique, Valérie et Cédric, Violaine et Joachim votre soutien inconditionnel a été primordial dans l'accomplissement de ce travail.

Un grand merci pour *Pr. Jean Pierre Marie* de m'avoir accueillie dans votre laboratoire

Je souhaite également adresser un grand merci à *MIRSHAHI Massoud* pour avoir assuré la direction de ma thèse et pour avoir su me faire profiter de votre expérience tout en me laissant construire la mienne. Votre rigueur, votre curiosité scientifique et votre esprit critique m'ont beaucoup appris

J'adresse mes plus sincères remerciements aux membres du jury :

- Professeur *Claudine Boterri* et Docteur *Lu He* qui ont accepté de faire partie de mon jury,
- Docteur *Laurent Garderet* et Docteur *Rémi Varin* qui me font l'honneur d'être les rapporteurs de ma thèse,
- Professeur *Christian Auclair* qui a accepté de présider cette thèse.

Un grand Merci à *Brigitte Bauvois* pour tes bons conseils scientifiques et ta superbe humeur perpétuelle.

Un grand Merci au Professeur *Amu Therwart* pour vos conseils toujours très pertinents et les bons moments passés ensemble.

Merci d'avoir consciencieusement décortiqué mon article, votre regard a été d'une grande aide pour affiner mes propos.

*A mes chères amies du labo*

Dalel, Marion, Samaher, Faten, Sandrine, Julia qui m'ont si souvent permis de décompresser et qui m'ont apporté un soutien sans faille.

Merci pour ces longues heures de conversation dans la pièce à manger (à côté de la paillasse), pour votre bonne humeur, je vous souhaite plein de bonnes choses dans vos vies.

Merci pour les bons moments passés ensemble et ceux à venir.

Je tiens à remercier très sincèrement *Mirshahi Pezhman* de m'avoir transmis avec patience toutes les connaissances qui font aujourd'hui ma richesse.

*Aux membres de l'équipe 18*

Cyril, Raphael, Nana, shah sultan, Patricia, Anne Marie, Fany, Ruoping

Merci à toute l'équipe 18 qui m'a accueillie et si vite intégrée à mes débuts.

La convivialité si précieuse qui vous caractérise tous m'a entourée pendant quatre années.

Christian, merci pour ta joie de vivre communicative.

Merci de m'avoir fait profiter de ton expérience et de tes conseils.

Un grand merci à mes collègues du restaurant « domaine de lintillac » : Arnaud, Luis, Bakary, Moon, Akram, Tof, Yakouba

Un grand Merci plus particulièrement à Jean qui m'a soutenue et supportée tout le long de ma thèse

Pour ta patience avec les « allô Jean, je suis en retard » ou « 70 couverts ..C'est trop »

Je souhaite une seule chose que tu rencontreras un jour la femme qui te conviendra

Je tenais également à remercier mes amis : Sihem, Najette, Naim, Karima, Souad, Romu, Shadia, merci pour vos petits messages qui ont rythmé ma thèse. Malgré la distance et les années, notre amitié est un des piliers de ma vie.

# Table des Matières

<b>Introduction.....</b>	<b>14</b>
<b>I. Le microenvironnement tumoral .....</b>	<b>15</b>
<b>1. Rôle du microenvironnement dans la progression tumorale .....</b>	<b>15</b>
<b>2. Composition du microenvironnement tumoral.....</b>	<b>16</b>
<u>2.1 Les différentes cellules du microenvironnement tumoral</u> .....	17
2.1.1. <i>Les cellules du système inflammatoire</i>	17
a. <i>Les macrophages associés à la tumeur</i>	17
b. <i>Les lymphocytes</i>	18
2.1.2. <i>Les cellules souches mésenchymateuses</i>	20
2.1.3. <i>Les fibroblastes associés au cancer</i>	21
2.1.4. <i>Les cellules endothéliales</i>	21
2.2. <u>La matrice extracellulaire (MEC)</u> .....	23
2.2.1. <i>Les collagènes</i>	23
2.2.2. <i>L'élastine</i>	24
2.1.3. <i>La fibronectine</i>	24
2.1.4. <i>La laminine</i>	24
2.1.5. <i>Les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes</i>	25
<b>3. Interaction cellules tumorales et stroma .....</b>	<b>25</b>
3.1. <u>Interactions cellule tumorale-matrice</u> .....	26
3.2.. <u>Interaction entre cellules de cancer solide et cellules non néoplasiques</u> ...	28
3.2.1. <i>Interactions des cellules tumorales avec les macrophages</i>	28
3.2.2. <i>Interactions des cellules tumorales avec les fibroblastes</i>	29

3.2.3. <i>Interactions cellules tumorales et cellules endothéliales</i>	30
3.3. <u>Interactions cellules leucémiques et le microenvironnement tumoral</u> .....	31
<b>II. L'axe IGF/IGF-R.....</b>	<b>33</b>
<b>1. La famille IGF.....</b>	<b>33</b>
1.1. <u>L'IGF-I</u> .....	33
1.2. <u>IGF-II</u> .....	34
1.3. <u>IGF-IR</u> .....	35
1.4. <u>IGF-IIR</u> .....	36
1.5. <u>Les IGFBP</u> .....	37
<b>2. Rôle physiologique et biologique du système IGF/ IGF-R.....</b>	<b>38</b>
2.1. <u>La transduction du signal de l'IGF-IR</u> .....	38
2.2. <u>Les voies de signalisations du système IGF/ IGF-R</u> .....	39
2.2.1. <i>La voie de signalisation PI3K</i>	40
2.2.2. <i>La voie de signalisation de MAPK</i>	40
2.2.3. <i>Interconnexion entre MAPK et PI3K</i>	41
2.2.4. <i>Les voies de signalisation alternatives</i>	42
<b>3. IGF/IGF-IR dans les cancers.....</b>	<b>43</b>
3.1. <u>Généralité</u> .....	43
- <i>L'IGF-I</i>	43
- <i>IGF-II</i>	44
3.2. <u>Les voies de signalisation d'IGF-IR impliquées dans le cancer</u> .....	45
3.3. <u>Les régulateurs de la voie IGF-/IGF-IR</u> .....	46
3.3.1. <i>IGFBP</i>	46
3.3.2. <i>PTEN</i>	46



3.3.3. <i>Autre Phosphatases</i>	47
3.4. <u>Le rôle d'IGFI-IGF-IR dans la cancérogenèse</u> .....	48
3.4.1. <i>Rôle de l'IGF-I dans la croissance et la prolifération tumorale</i>	49
a. <i>Cycle cellulaire</i>	50
b. <i>Survie et apoptose</i>	51
3.4.2. <i>Angiogenèse</i>	54
a. <i>Migration et prolifération des cellules endothéliales</i>	57
b. <i>Les métalloprotéases impliquées dans l'angiogenèse tumoral.</i>	58
c. <i>Rôle d'IGF-I dans l'angiogenèse des cancers solides</i>	59
d. <i>L'angiogenèse dans les maladies hématologiques malignes</i>	59
3.4.3. <i>Migration et invasion</i>	60
a. <i>Rôle d'IGF-I</i>	61
3.5. <u>L'IGF-IR, cible thérapeutique</u> .....	62
<b>III. Chimiorésistance .....</b>	<b>64</b>
1. <b>Généralités.....</b>	<b>64</b>
2. <b>La famille des protéines ABC .....</b>	<b>65</b>
3. <b>La chimiorésistance par les cellules stromales mésenchymateuses.....</b>	<b>66</b>
4. <b>Le rôle des hospicells dans protection des cellules cancéreuses.....</b>	<b>67</b>
<b>IV. Objectifs de travail.....</b>	<b>69</b>
<b>V. Matériels et Méthodes.....</b>	<b>70</b>
1. <b>Culture cellulaire .....</b>	<b>70</b>

1.1	<u>Lignées cellulaires</u>	70
1.2.	<u>Hospicells</u>	70
1.2.1	<i>Hospicells isolées à partir des ascites</i>	70
1.2.2.	<i>Hospicells isolées à partir de la moelle osseuse</i>	70
1.3.	<u>Préparation du surnageant des hospicells (cellules M16)</u>	72
1.4.	<u>Traitement des cellules avec IGF-I et inhibiteurs</u>	72
<b>2.</b>	<b>Reverse transcription et polymerase chain reaction (RT-PCR)</b>	<b>73</b>
2.1.	<u>Extraction des ARN messagers (ARNm) et transcription inverse</u>	73
2.2.	<u>Polymerase chain reaction (PCR)</u>	73
<b>3.</b>	<b>Immunocytochimie</b>	<b>75</b>
3.1.	<u>Expression des protéines IGF par les cellules OVACR3 et les cellules</u> <u>Leucémiques</u>	75
3.2.	<u>Etude de l'expression de la protéine P-gp</u>	75
<b>4.</b>	<b>Les expériences de la chimiorésistance des cellules tumorales</b>	<b>76</b>
4.1.	<u>Effet des hospicells isolées d'ascites sur la chimiorésistance des cellules</u> <u>OVCAR3</u>	76
4.2.	<u>Effet des hospicells de la moelle osseuse sur la chimiorésistance</u> <u>des cellules leucémiques HL60 et HL60/DNR</u>	76
<b>5.</b>	<b>Analyse de l'expression des gènes ABC par les hospicells en Gene Array</b>	<b>77</b>
<b>6.</b>	<b>Analyse de niveau de sécrétion des protéines de la famille IGF par les cellules</b> <b>M16, par la méthode de protéine Array</b>	<b>77</b>
<b>7.</b>	<b>Analyses statistiques</b>	<b>78</b>

**VI. Résultats .....79**

**Article 1 .....80**

Ovarian ascites-derived hospicells promote up regulation of the ATP-binding cassette genes by Insulin-like Growth Factor-I via JAK-STAT3, MEK signaling pathway in ovarian cancer cell line

**Article 2.....108**

A bone marrow stromal cell, Hospicell, regulate ATP-binding cassette genes expression *via* Insulin-like Growth Factor-I in leukemic cell line (HL60)

**Article 3.....138**

Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis

**Article 4 .....139**

Matrix metalloproteinase-9 is required for tubular network formation and migration of resistant breast cancer cells MCF-7 through PKC and ERK1/2 signalling pathways.

**VII. Conclusion.....140**

**VIII. Références .....141**

**IX. Annexes.....159**

## Liste des principales abréviations

aa	Acide aminé
Ac	Anticorps
ALS	Acid labil subunit
Ang	Angiopoietine
AKT	Protéine Kinase B
BMSC	Bone marrow stromal cell
CAF	Fibroblastes associées au cancer
CCR	Chemokine, CC motif, receptor
CD	Cluster of differentiation
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CXCR	CXC chemokine Receptor
CE	Cellules endothéliales
CCL	CC motif ligand chimiokine
EGF	Epidermal growth factor
ErbB	Epidermal growth factor receptor (EGFR) family
Erk	Extracellular signal-regulated kinase
FAK	Focal Adhesion Kinase
FGF	Fibroblast growth factor
FOXO	Forkhead Fox-O
GH	Growth Hormone
GHR	GH receptor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
HIF-1	Hypoxia-Inducible Factor
HGF	Hepatocyte Growth Factor
ICAM	Intercellular cell adhesion molecule
IFN- $\gamma$	Interferon gamma
Ig	Immunoglobuline
IGF	Insulin like growth factor

IGF-R	Récepteur de l'IGF
IGFBP	IGF Binding Protein
IL-	Interleukine
INSR	Récepteur à insuline
IRS	Insulin receptor substrate
JAK	Janus kinase
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEC	Matrice extracellulaire
MM	Myélome Multiple
MMP	Matrix Metalloproteinase
MO	Moelle osseuse
CMS	Cellules souches mésenchymateuses
mTOR	Mammalian target of rapamycin
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor $\kappa$ B
PDGF	Platelet-derived growth factor
PEDF	Pigment-epithelium-derived factor
PI-3K	Phosphatidylinositol-3 kinase
PKC	Protéine Kinase C
$\alpha$ SMA	$\alpha$ actine des cellules musculaires lisses
SDF-1	Stromal cell Derived Factor-1
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TAM	Macrophage associés aux tumeurs
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
Treg	lymphocyte T régulateurs/suppresseurs
uPA	Activateur de Plasminogène de type vasculaire
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Récepteur du VEGF

## Figures

**Figure 1.** Le microenvironnement composé de différents types cellulaires (Weinberg, 2007).

**Figure 2.** Différenciation des monocytes en TAM

**Figure 3.** Interaction cellule tumorale avec microenvironnement (Ungefroren *et al.*, 2011)

**Figure 4.** Structure moléculaire des interactions cellule-matrice

**Figure 5.** Interactions entre TAMs et les cellules tumorales.

**Figure 6.** Interactions des cellules endothéliales et avec les cellules tumorales (Mirshahi, 2010)

**Figure 7.** Régulation physiologique d'IGF (Moro-Sibilot *et al.*, 2010).

**Figure 8.** Structure schématique du récepteur IGF-IR

**Figure 9.** Les voies de signalisation du récepteur IGF-IR

**Figure 10.** Interconnexions entre les voies de signalisations de l'IGF-IR

**Figure 11.** L'influence de signalisation d'IGF dans l'oncogenèse (Pollak et al, 2004).

**Figure 12.** La voie de signalisation IGF-1R (Tao *et al.*, 2007)

**Figure 13.** Les actions d'IGF1 dans les différents étapes du développement tumoral (Clemmons *et al.*, 2007)

**Figure 14.** Rôle de la voie de signalisation de IGF-IR dans le cycle cellulaire (Samani *et al.*, 2006)

**Figure 15.** Les deux voies d'activation de l'apoptose et la régulation par IGF (Weinberg, 2007).

**Figure 16.** Schéma représentant le processus d'Angiogenèse (Méjean et Lebreton, 2008)

**Figure 17.** Le switch angiogénique

**Figure 18.** Principales étapes impliquées dans l'activation des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse

**Figure 19.** Morphologie des hospicells (Rafii *et al.*, 2008)

**Figure 20.** Fixation des cellules HL60 sur les hospicells et formation des rosettes après 18h d'incubation

**Tableau1.** Les caractéristiques moléculaires des membres de la famille IGF (Yu et Rohan, 2000).

**Tableau 2.** Principaux facteurs pro- et anti-angiogéniques.

**Tableau 3.** Les caractéristiques des principales protéines ABC

**Tableau 4.** Séquences des amorces utilisées pour la PCR

## **Introduction**

Le cancer est un véritable problème de santé public, puisqu'il est la première cause de mortalité en France aujourd'hui avec 30% des décès selon les chiffres de la Haute Autorité de Santé en 2004. Le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur au cours des différentes étapes du développement du cancer et de la dissémination métastatique. De plus, les interactions entre les différentes cellules du microenvironnement et les cellules cancéreuses peuvent conduire ces dernières à résister aux traitements de chimiothérapie. Ainsi, l'étude de ces interactions est importante pour que des thérapies ciblées luttent contre la progression tumorale. Dans le cadre de la recherche des nouvelles cibles thérapeutiques, les inhibiteurs du facteur de croissance IGF-I (Insulin-like Growth Factor), en association avec d'autres traitements anticancéreux, pourraient limiter la chimiorésistance et inhiber la progression des cancers ainsi que les métastases. Ainsi, des thérapies ciblées prometteuses ont été développées telles que la thérapie anti-angiogénique.

L'IGF-I, en plus de son rôle positif dans la croissance et la progression de nombreux cancers, est surexprimé dans certaines tumeurs à potentiel métastatique et chimiorésistantes. Mon projet de thèse vise à étudier l'implication de l'IGF-I, sécrété par le microenvironnement tumoral, dans la survie des cellules cancéreuses et dans la régulation de l'expression des protéines impliquées dans la chimiorésistance des cellules du cancer de l'ovaire et les cellules leucémiques.



# **I. LE MICROENVIRONNEMENT TUMORAL**

## **1. Rôle du microenvironnement dans la progression tumorale**

L'étude du microenvironnement tumoral joue un rôle primordial pour la compréhension du développement des tumeurs et, par conséquent, pour les approches thérapeutiques à mettre en œuvre. Cependant, les différents types cellulaires du microenvironnement entrent en réactions avec une matrice extracellulaire (MEC), jouant un rôle primordial dans la progression tumorale ainsi que la métastase.

En 1889, le concept du « seed and soil » (de la graine et du sol) a été fondé par Stephen Paget, basé sur une étude selon laquelle les métastases ne se faisaient pas de façon aléatoire mais plutôt répondaient à une adéquation entre les cellules tumorales (seed) et l'environnement (soil) pour engendrer une métastase (Paget, 1889). Pendant de nombreuses années, le concept de Paget a été ignoré par les chercheurs, qui se sont concentrés de façon plus importante sur la génétique des tumeurs. Récemment, un groupe d'oncologues a revu l'idée de Paget et a prêté attention aux interactions entre les cellules tumorales, les cellules stromales et la matrice extracellulaire. (Merlo *et al.*, 2006). Par ailleurs, une étude récente montre que la majorité des décès liés au cancer sont le résultat de la résistance des métastases aux traitements conventionnels ou des thérapies utilisés avec succès dans le traitement des cancers primitifs (Ribatti *et al.*, 2006). Les changements que subit la cellule tumorale, induits par le microenvironnement, pourraient expliquer le phénomène de chimiorésistance.

*Lors de l'évolution des cellules tumorales, l'environnement est crucial pour leur survie, leur croissance et leur progression. A ce titre le microenvironnement tumoral est devenu une cible privilégiée pour étudier de nouvelles approches pour le traitement des cancers. Il devient alors important d'en étudier les différents éléments et leurs implications dans la survie et le développement de la tumeur.*

## 2. Composition du microenvironnement tumoral

Il est désormais largement admis qu'il existe une forte liaison entre la progression de la tumeur vers un phénotype malin, d'une part, et les interactions écologiques entre les cellules tumorales et les différents composants de leur microenvironnement, d'autre part. Ces derniers peuvent jouer un rôle stimulant ou inhibiteur dans la progression tumorale, en régulant l'expression des gènes dans les cellules tumorales et les cellules stromales.

Plusieurs termes tels que : environnement, microenvironnement ou stroma seront utilisés de la même manière dans ce mémoire pour décrire l'entourage de la cellule tumorale. Ce microenvironnement est principalement composé d'éléments acellulaires de la matrice extracellulaire et d'une partie cellulaire, représentée par des fibroblastes, des cellules inflammatoires, des cellules stromales et des cellules composant les vaisseaux sanguins (les cellules endothéliales) (Figure 1). Tous ces composants interagissent entre eux *via* les facteurs de croissance, les cytokines et les molécules d'adhésion. Les interactions dynamiques entre les cellules épithéliales et stromales jouent un rôle essentiel dans les différents processus du développement du cancer, tels que l'adhésion, la prolifération, la différenciation et la migration cellulaire.

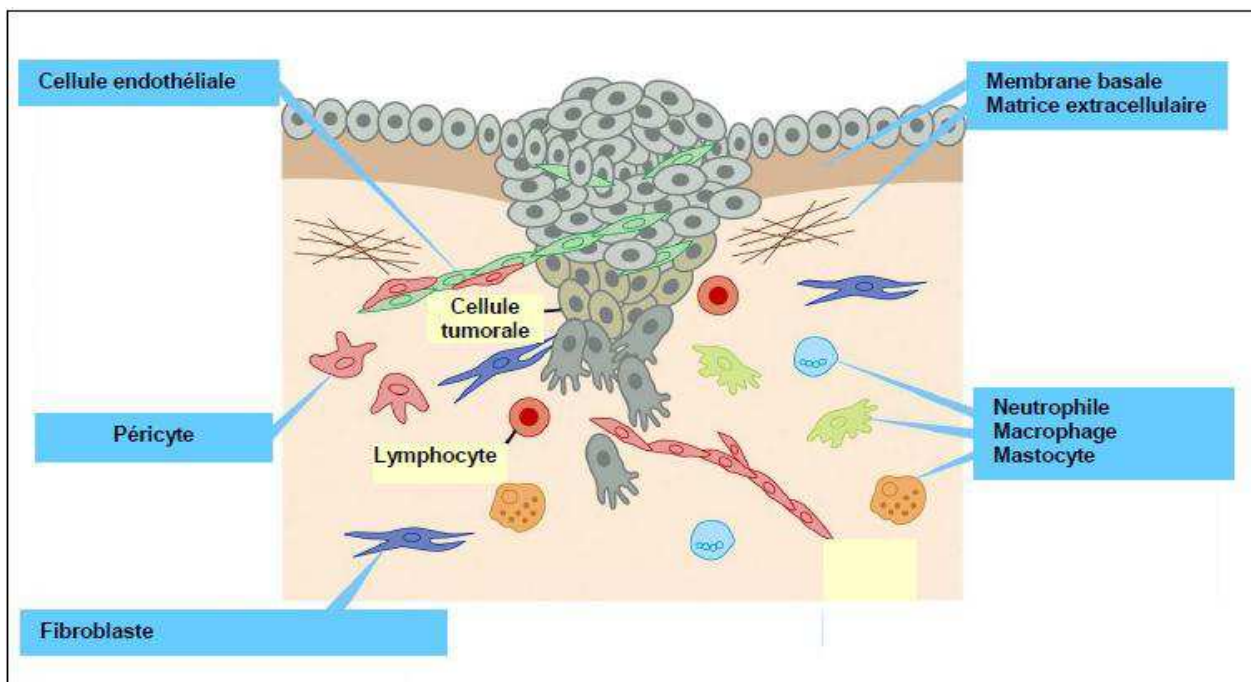


Figure 1 : Le microenvironnement composé de différents types cellulaires (Weinberg, 2007).

## 2.1. Les différentes cellules du microenvironnement tumoral

### *2.1.1. Les cellules du système inflammatoire*

Le processus de l'inflammation, associé au développement de la tumeur, est une question centrale pour la biologie de la tumeur et de l'immunologie. Au sein de l'infiltrat péri-tumoral et du stroma, l'accumulation d'une variété de cellules du système immunitaire et cellules inflammatoires a été observée : lymphocytes T (CD4 et CD8), macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles, et monocytes (Balkawill et Mantovani, 2001). Ces cellules peuvent avoir une action pro- ou anti-tumoral. Parallèlement, le mécanisme de surveillance immunitaire sert à reconnaître et à éliminer des cellules tumorales. En effet, des défauts dans la surveillance immunitaire provoquent la progression tumorale.

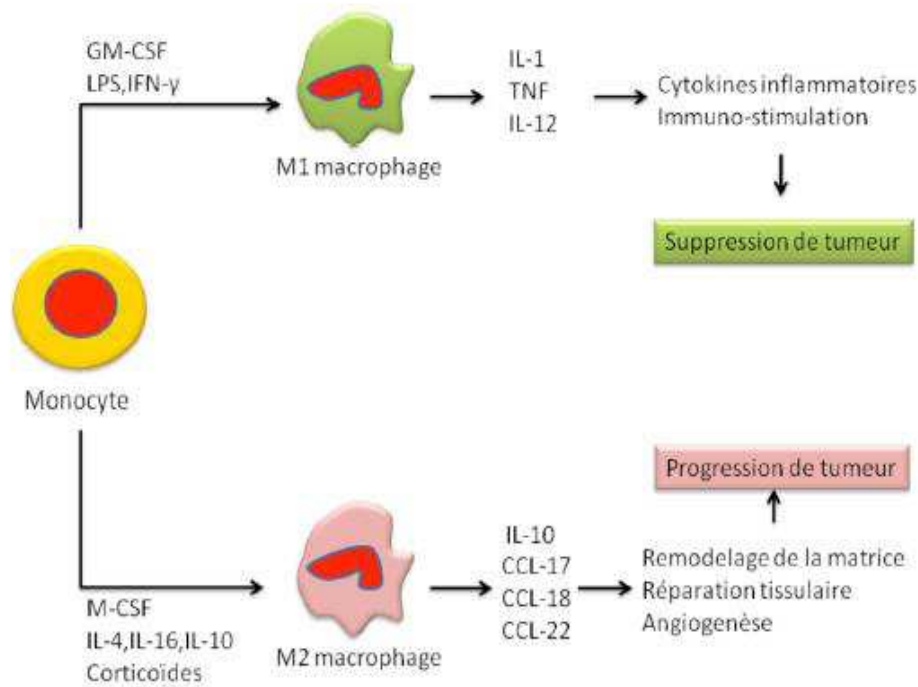
L'infiltration tumorale nécessite deux facteurs importants, l'inflammation et la sécrétion des chimiokines solubles par les cellules tumorale et les cellules stromales (Green et *al.*, 2009 ; Wang et *al.*, 2006). En effet, au cours des premiers stades de cancérogenèse, ces chimiokines vont stimuler l'infiltration des cellules du système immunitaire dans le microenvironnement tumoral. Elles vont ainsi promouvoir un effet anti-tumoral *via* l'élimination des cellules néoplasique par les macrophages. Cependant, les cellules tumorales détournent à leur profit l'action des cellules immunitaires au cours du développement tumoral, *via* la sécrétion des chimiokines. Ces dernières stimulent alors les cellules immunitaires pour favoriser le processus d'angiogenèse, ce qui améliore la survie et la croissance des cellules tumorales (Raman et *al.*, 2007).

#### *a. Les macrophages associés à la tumeur*

Les Macrophages Associés à la Tumeur (TAM) s sont dérivés des monocytes sanguins. Ces macrophages sont recrutés et dirigés par des chimiokines, des facteurs de croissance et des facteurs angiogéniques, sécrétés par les cellules tumorales, tels que colony-stimulating factor-1 (CSF-1), facteur de croissance vasculaire endothéliale (VEGF), et angiopoïétine-2 (Lewis et Pollard, 2006 ; Sica et Bronte, 2007). Ces facteurs sont importants dans le recrutement et l'impulsion directionnelle des monocytes du sang circulant, ceux-ci devront être rapidement intégrés au sein du microenvironnement tumoral. Au sein du microenvironnement tumoral, les monocytes recrutés se différencient en TAMs, qui rentrent alors en symbiose avec les cellules

tumorales. Selon les cytokines présentes dans la tumeur, les monocytes deviennent soit des macrophages M1, soit des macrophages M2 dont l'action est opposée (Figure 2). En effet, les macrophages M1, activés en réponse à l'interféron  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ) ou à des composants bactériens, tels que les lipopolysaccharides, produisent un taux élevé d'IL-12, d'IL-23 et d'oxyde nitrique (NO). Ce phénomène permet de développer une capacité importante à présenter l'antigène. Ces macrophages ont essentiellement une activité dans la défense antibactérienne et la suppression de tumeur. En revanche, les macrophages M2 sont activés sous l'effet des signaux tel que IL-4, IL-13, IL-10 et M-CSF, et ont une activité dans la progression des tumeurs. Ces macrophages produisent un niveau élevé d'IL-10 et un faible niveau d'IL-12, ce qui provoque une faible capacité à présenter l'antigène. Les macrophages M2 favoriseraient ainsi la progression tumorale en s'impliquant dans l'angiogenèse (Coussens et Werb, 2002) et dans le remodelage de la matrice extracellulaire, puisqu'ils produisent également des métalloprotéases (MMP-2 et MMP-9). Ils ont également un rôle dans la différenciation des cellules T régulatrices (Treg) en se liant à la membrane de ces cellules par l'intermédiaire d'un médiateur immunosuppresseur, le TGF- $\beta$ 1, exprimé sur leur surface. Cela entraîne la suppression des cellules T anti-tumorales et des autres cellules inflammatoires, telles que les monocytes (Savage et *al.*, 2008).

Une étude a mis en évidence des signatures moléculaires caractéristiques des macrophages, associées à un mauvais pronostic du cancer du sein, comme CD68 (Paik et *al.*, 2004). Une haute densité de TAM dans la tumeur est maintenant reconnue comme un mauvais pronostic dans divers type de cancer. De plus, des études réalisées sur des modèles animaux ont confirmé l'intérêt thérapeutique important de cibler la tumeur, *via* les macrophages, (Valable et *al.*, 2006 ; Choi et *al.*, 2007).



**Figure 2 : Différenciation des monocytes en TAM**

### *b. Les lymphocytes*

Les tumeurs sont souvent infiltrées par les cellules lymphocytaires ou les cellules dendritiques. Le système immunitaire influe fortement sur les résultats cliniques chez les patients atteints du cancer. En effet, la présence et la densité des Lymphocytes Infiltrant la Tumeur (TIL) chez ces patients est associée à un pronostic favorable (Sakaguchi, 2000). En revanche, le microenvironnement tumoral peut réduire la réponse immunitaire en diminuant l'activation des cellules T et la maturation des cellules présentatrices de l'antigène *via* la sécrétion des cytokines pro-tumorales. En effet, des cytokines ayant des effets inhibiteurs sur la réponse immunitaire, telles que TGF- $\beta$  et IL-10, peuvent être sécrétées par le stroma et par les cellules tumorales. Les lymphocytes T régulateurs/suppresseurs (T reg) qui contrôlent l'immuno-tolérance, et qui possèdent le phénotype CD4<sup>+</sup> et CD25<sup>+</sup> sont également nombreux dans les tumeurs. Ils ont un rôle essentiel dans la suppression de la prolifération des cellules T *via* TGF- $\beta$ , et participent donc à l'échappement immunitaire des cellules tumorales (Liu et *al.*, 2007).

### 2.1.2. Les cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM), connues aussi sous le nom de cellules stromales mésenchymateuses, sont définies comme une population de cellules hétérogènes non hématopoïétiques. Elles sont isolées à partir de nombreux tissus tels que la moelle osseuse, le tissu adipeux, le placenta. (Uccelli *et al.*, 2008 ; Sundelacruz et Kaplan, 2009). Ces cellules sont multipotentes et caractérisées par trois critères majeurs (Dominici *et al.*, 2006) :

- leur capacité d'adhérence ;
- leur potentiel à se différencier en trois types cellulaires chondrocytes, ostéoblastes et adipocytes, en fonction de différents stimuli et de leurs environnements;
- leurs phénotypes : expression de CD73 (ecto 5' nucléotidase), CD90 (Thy-1), CD105 (Endogline), et absence d'expression de marqueurs hématopoïétiques CD45 (Leucocyte common antigen) et CD 34.

Les CSMs sont caractérisées par l'expression d'un grand nombre de molécules d'adhésion. De plus, ces cellules produisent différentes cytokines et facteurs de croissance, ainsi que les protéines de MEC telles que la fibronectine ou la laminine. Toutefois, les CSMs exercent diverses actions selon leur l'origine et le site de la tumeur. En effet, les CSMs peuvent avoir des activités stimulatrices ou inhibitrices sur la progression tumorale à travers leurs propriétés immuno-modulatrices ou pro-angiogéniques. (Kidd *et al.*, 2008).

Par ailleurs, l'inhibition de l'activité de la voie de signalisation AKT des cellules tumorales par les CSMs induit l'inhibition de la croissance de certaines tumeurs (Khakoo *et al.*, 2006). A l'inverse, les CSMs contribuent à la formation du stroma associé à la tumeur (Hall *et al.*, 2007). En effet, une étude sur des souris immunodéficientes, au cours de laquelle des CSMs ont été co-implantées avec des lignées cellulaires du cancer du sein (MDA-MB-231), a montré que la formation de métastase est favorisée et liée à la sécrétion de la chimiokine CCL5 (Rantes). Cette étude suggère que les CSMs favorisent, à travers leurs pouvoirs immuno-suppresseurs sur les lymphocytes B et T et leurs effets pro-angiogénique, la croissance tumorale, et le processus de métastase (Karnoub *et al.*, 2007).

### 2.1.3. Les fibroblastes associés au cancer

Les fibroblastes produisent la majorité des composants de la MEC tel que les MMPs, collagène, fibronectine et laminine (Sappino *et al.*, 1990) qui leur confèrent un rôle majeur dans le remodelage de la MEC. Ils participent également aux défenses anti-infectieuses, en sécrétant des facteurs chimiotactiques et l'interféron- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), ainsi qu'au processus de cicatrisation.

Les cellules fibroblastiques sont présentes de façon plus importante dans le stroma tumoral que dans le stroma sain. Toutefois, les caractéristiques des fibroblastes associés à la tumeur (CAF, nommés également myofibroblastes) et ceux du stroma sain ne sont pas tout à fait identiques. Il est donc essentiel de comprendre les mécanismes moléculaires qui influent sur l'environnement tumoral.

Les CAFs, à l'inverse des fibroblastes du microenvironnement sains, ont la capacité de proliférer plus vite. En plus, ces cellules expriment l' $\alpha$ -actine présente dans les cellules musculaires lisses ( $\alpha$ -SMA) et certains facteurs de croissances comme IGF-1 et IGF-2 (Insulin-like Growth Factor), PDGF- $\beta$  (Platelet-Derived Growth Factor) et HGF- $\beta$  (Hepatocyte Growth Factor) (Kalluri et Zeisberg, 2006). Sous l'effet de ces cytokines, les cellules CAFs déterminent le dynamisme de la tumeur en jouant un rôle important dans l'angiogenèse. En effet, elles favorisent la communication paracrine avec d'autres cellules du stroma tumoral, l'invasion et la migration cellulaire, et peuvent influencer l'efficacité des médicaments anticancéreux sur les cellules malignes (Morin, 2003).

Une étude a montré que la surexpression, par les CAFs, du récepteur de PDGF activé, est associée à un potentiel métastatique accru dans le cancer du colon (Kitadai *et al.*, 2006). A l'inverse, son inhibition réduit la prolifération des CAFs *in vitro* et ralentit la progression et la formation des métastases de certains cancers tel que le cancer du col (Pietras *et al.*, 2008). Les chimiokines CXCL-12 et CXCL-14 sont exprimées également par les CAFs et stimulent la croissance et l'angiogenèse des cellules tumorales par l'intermédiaire de leurs récepteur CXCR4 (Orimo et Weinberg, 2006).

#### 2.1.4. Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales, qui participent à la structure des vaisseaux sanguins et lymphatiques, sont d'origine mésenchymateuse. Ce positionnement stratégique leur permet de maintenir une barrière naturelle entre le flux sanguin et les autres couches de vaisseaux. Les vaisseaux sanguins tumoraux sont reconnus pour leur forte implication dans le processus du développement tumoral, depuis que folkman (1971) a introduit le concept de « croissance tumorale dépendante de la formation de nouveaux vaisseaux sanguins appelée aussi angiogenèse ». En effet, le phénomène d'angiogenèse est nécessaire à la progression et la formation de métastases des cancers puisqu'il alimente la tumeur en oxygène et en nutriments.

Par conséquent, l'hypoxie tumorale devient un facteur majeur lors de l'angiogenèse. Ainsi, plusieurs facteurs de croissance sont sécrétés par les cellules tumorales comme hypoxie inductible factor-1 (HIF-1), bFGF, PDGF et le puissant facteur pro-angiogénique VEGF. Ces facteurs vont stimuler les récepteurs de tyrosine kinase, présents sur la surface des cellules endothéliales et favoriser ainsi la néo-vascularisation autour de la tumeur (Liao et johnson, 2007).

Le rôle central de VEGF dans l'angiogenèse et la progression tumorale a été le moteur de plusieurs études visant le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Ces dernières, inhibiteur de VEGF (bevacizumab), inhibiteurs des récepteurs tyrosine kinases du VEGF (sorafenib, sunitinib), cherchent à bloquer la néo-vascularisation. Plusieurs essais cliniques ont montré que l'utilisation du traitement anti-angiogénique, en association avec la chimiothérapie, permet, dans un premier temps, une meilleure efficacité sur la survie des patients atteints de différents types de cancer (Gasparini *et al.*, 2005), et une diminution de la taille de la tumeur. Cependant, cette amélioration est généralement suivie d'une reprise de la croissance tumorale et de la formation des métastases dues à une résistance à la thérapie (Ebos *et al.*, 2009).

Les métastases peuvent également emprunter la voie lymphatique (appelée lymphangiogenèse) pour envahir les ganglions. Cette voie suit une trajectoire semblable à l'angiogenèse au cours du développement tumoral. Ce processus est favorisé par de puissants facteurs pro-angiogéniques, VEGF-C et VEGF-D, sécrétés par les cellules tumorales et les cellules



stromales. Ils se fixent sur leurs récepteurs, présents sur les cellules endothéliales (Onogawa *et al.*, 2004 ; Tammela *et al.*, 2005).

## 2.2. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est une structure tridimensionnelle bien organisée autour des cellules et joue plusieurs rôles physiologiques et pathologiques. Elle isole les compartiments tissulaires et maintient l'intégralité des tissus (Pupa *et al.*, 2002), régule la différenciation et la prolifération (Marastoni *et al.*, 2008), l'adhésion, la migration et l'invasion (Assoian *et Marcantonio*, 1996) des cellules et, enfin, assure le support et la communication cellulaires en fournissant les facteurs de croissances et les cytokines (Schultz *et Wysocki*, 2009).

En fonction du tissu, du microenvironnement et de ses fonctions, elle existe dans différents isoformes, tels que le tissu conjonctif, la membrane basale, ou bien le cartilage. La MEC est composée principalement de trois classes de macromolécules : des polysaccharides (glycosaminoglycanes et protéoglycane), des protéines fibreuses (collagène et élastine) et des protéines d'adhérences (fibronectine et laminine). Ces composants sont agencés de manière très organisée et jouent le rôle de charpente de la cellule, assurent l'interaction cellule-cellule, cellule-matrice et aident ainsi la progression tumorale (Bowers *et al.*, 2010).

### *2.2.1. Les collagènes*

Les collagènes, composants les plus abondants de la matrice extracellulaire, sont des structures complexes de protéines. Parmi la grande famille des collagènes, on distingue 28 membres génétiquement distincts chez l'homme (Cen *et al.*, 2008). Les collagènes forment une structure hélicoïdale en triple hélices avec trois chaînes polypeptidiques alpha, celle-ci les rend insensible à des protéases comme la pepsine, seules les collagénases sont capables de cliver la triple hélice. Les protéines du collagène sont synthétisées sous forme inactive nommées procollagènes. L'excision des propeptides localisés dans les extrémités amino- et carboxy terminale forme des molécules de collagènes matures actifs. Un important remodelage extracellulaire, ou une variation de la teneur en collagène, sont les résultats de mutations de gènes

codant des protéines de sa composition. Ces mutations peuvent générer de multiples dysfonctionnements, tels que la tumeur ou encore les maladies fibrotiques (Gonzalez et *al.*, 2004).

### 2.2.2. *L'élastine*

L'élastine est une protéine fibreuse, sécrétée par les fibroblastes, essentiellement pendant la période de croissance. Contrairement au collagène, l'élastine, qui est présente aussi dans le tissu conjonctif, possède, comme son nom l'indique, des propriétés élastiques.

### 2.2.3. *La fibronectine*

La fibronectine (FN) est une glycoprotéine extracellulaire ubiquitaire de haut poids moléculaire (environ 500 kDa). La FN est une protéine abondante de la MEC où elle est sécrétée par les fibroblastes sous forme de dimère soluble, assemblée ensuite en réseau fibrillaire insoluble à la surface cellulaire, formant une fibronectine de la matrice. Les deux monomères de la fibronectine sont reliés par deux ponts disulfures à leur extrémité C-terminale. Cette protéine existe sous forme de plusieurs isoformes selon le type cellulaire, le tissu et le stade de développement, résultats d'un épissage alternatif. La structure compacte et pliée de la fibronectine contient plusieurs sites de liaisons pour une variété de molécules de surface cellulaire et des molécules extracellulaires. En effet, la fibronectine peut se lier simultanément à des cellules grâce à des molécules d'adhérences (intégrines) et à d'autres molécules de la matrice extracellulaire (collagène, protéoglycane.), y compris à une autre molécule de fibronectine (Vakonaki et Campbell, 2007). Le rôle majeur de la fibronectine est l'adhérence cellulaire avec le tissu conjonctif, mais elle intervient aussi comme un site de stockage de différents facteurs de croissance et régule la prolifération et la différenciation cellulaire (Steward et *al.*, 2011). Une étude a montré que la fibronectine peut également favoriser l'invasion cellulaire *via* la phosphorylation de la kinase focale d'adhésion (FAK) en se liant aux intégrines (Ding et *al.*, 2008).

#### 2.2.4. *La laminine*

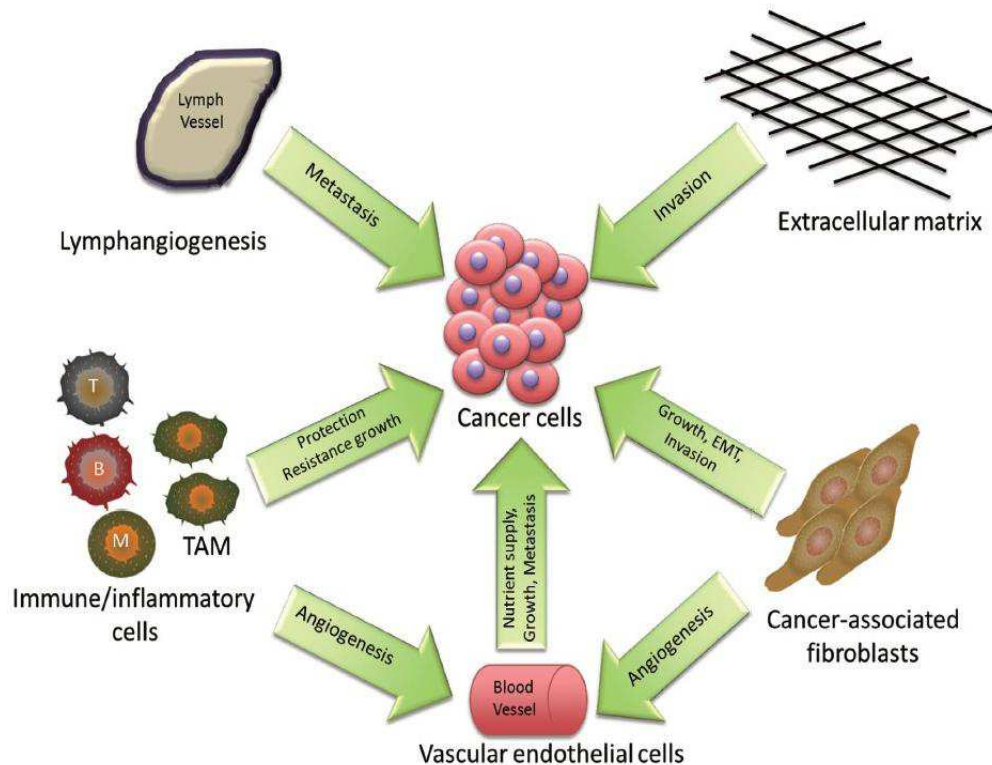
Il s'agit d'une glycoprotéine majeure dans la membrane basale, composée de trois chaînes  $\alpha$ ,  $\beta$ , et  $\gamma$  qui fixent des intégrines. La laminine joue un rôle en s'associant avec la fibronectine et les protéines fibrillaires comme substrat pour la migration cellulaire.

#### 2.2.5. *Les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes*

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont de longues chaînes polysaccharidiques linéaires, formées de la répétition d'un même motif disaccharidique. Les principaux GAG présents dans la MEC existent sous cinq formes: l'acide hyaluronique, le chondroïtine-sulfate, le dermatane-sulfate, l'haparine, et enfin kératane-sulfate. Les protéoglycanes tels qu'aggrecan, perlecan et decorin sont formés par un noyau protéique sur lequel se lie de manière covalente la plupart des GAG (sauf l'acide hyaluronique). Ils interviennent dans la stabilisation de la paroi vasculaire ou encore dans le processus de l'angiogenèse (Delehedde *et al.*, 2008 ; Nelson *et al.*, 1995).

### 3. Interactions cellulaires tumorales et stroma

Une étude détaillée sur les interactions complexes entre les cellules tumorales et leurs microenvironnements adjacents est essentielle afin de mieux comprendre les différents mécanismes impliqués dans le processus de développement de la tumeur et de la formation des métastases. Ces interactions sont déterminées par les propriétés structurales et biochimiques de la MEC (Brabek *et al.* 2010) ainsi que par la communication avec les cellules non néoplasiques telles que les cellules endothéliales (CE), les fibroblastes associés au cancer (CAF), les cellules souches mésenchymateuses (CSM) et une variété de différentes cellules immunitaires comme les macrophages associés à la tumeur (TAM) (Ungefroren *et al.*, 2011) (Figure 3).



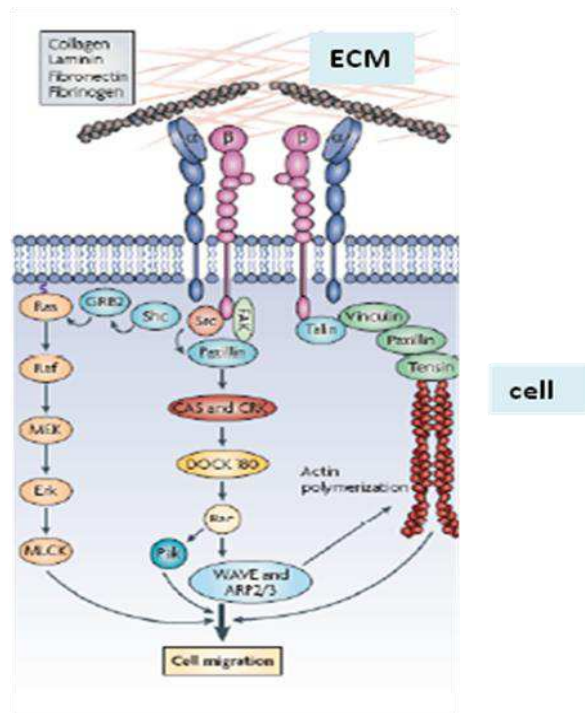
**Figure 3 : Interactions cellule tumorale avec le microenvironnement**

### 3.1. Interactions cellule tumorale-matrice extracellulaire

L'invasion de la MEC est un processus mécanique essentiel pour la progression de la tumeur et de la métastase. Ce processus dépend de l'expression des molécules d'adhésion et des enzymes de dégradation de la matrice. Ces interactions cellule-matrice sont facilitées par les composants de la matrice comme la fibronectine, la laminine, le collagène et la vitronectine. Les récepteurs majeurs de ces composants pour la matrice sont les intégrines. Ces dernières sont des glycoprotéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion cellulaire ; elles jouent également le rôle de récepteurs capables de transmettre des signaux de la cellule à la matrice et inversement. Chez l'homme, 18 sous-unités  $\alpha$ , 8  $\beta$  et 24  $\alpha$ - $\beta$  hétérodimères d'intégrines ont été identifiées à ce jour. Cette diversité dans la composition des sous-unités permet aux intégrines de reconnaître un large spectre de ligands dans la MEC, mais aussi au niveau cellulaire. L'interaction des intégrines avec la matrice provoque une activation de protéines de signalisation localisées dans des sites d'adhésion focales, telles que vinculin, talin, p130<sup>CAS</sup> et filamine A (Geiger *et al.*, 2001 ; Mohl *et*

*al.*, 2009). Talin se lie directement à l'intégrine  $\beta$ -1 qui va se lier à son tour à la protéine liant l'actine, la vinculine (Figure 4). Talin joue non seulement un rôle important de liaison entre intégrine et F-actine, mais aussi dans l'activation des intégrines (Ginsberg *et al.*, 2005 ; Shattil *et al.*, 2010). Une étude récente a montré que SHARPIN, un inhibiteur endogène de l'activation de l'intégrine- $\beta$ 1, perturbe le recrutement de talin et l'activation des intégrines (Rantala *et al.*, 2011). En parallèle, l'intégrine se lie à FAK, un activateur de Ras. FAK devient phosphorylé et forme un complexe avec la kinase Src et Grb2, ce qui entraîne l'activation de la voie MAP-kinase.

Il existe de nombreuses anomalies de l'expression des intégrines au niveau des tumeurs. Par exemple, l'intégrine  $\alpha$ v $\beta$ 3 est surexprimée par les cellules endothéliales activées lors de l'angiogenèse. Actuellement, elle est considérée comme un marqueur de pronostic dans le mélanome invasif (Albelda *et al.*, 1990 ; Hieken *et al.*, 1996). En outre, l'intégrine  $\beta$ 4 est connue pour son implication dans la régulation du cycle cellulaire, puisqu'elle induit des inhibiteurs de cyclines kinases dépendant (CDKi) tels que la protéine P21 et induit ainsi l'arrêt de la croissance cellulaire (Clarke *et al.*, 1995). L'inhibition de la signalisation de certaines intégrines réprime l'invasion et la migration des cellules tumorales. De ce fait, les intégrines et leurs médiateurs sont devenues des cibles thérapeutiques anticancéreuses. Par conséquent, le ciblage de plusieurs intégrines, telles que l'intégrine  $\beta$ 1 (Cordes et Park, 2007) et plus particulièrement l' $\alpha$ 5 $\beta$ 1 (volociximab, Eos-200-4, M-200) (Tucker, 2006), est actuellement préconisé dans des études cliniques portant sur différents types de tumeurs.

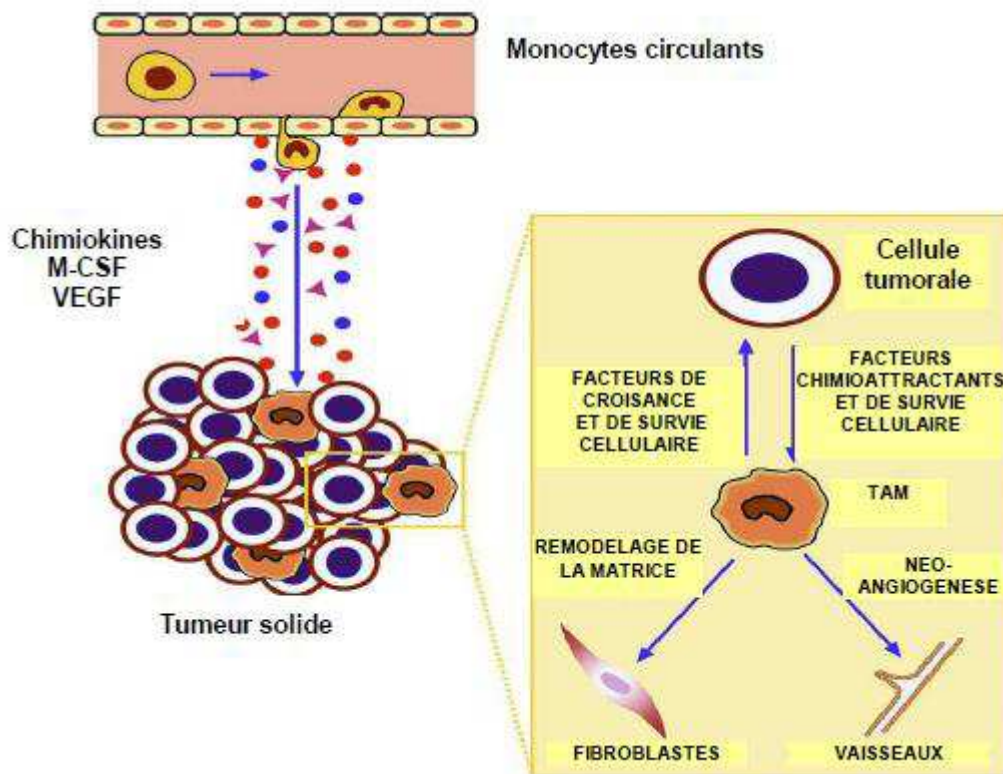


**Figure 4 : Structure moléculaire des interactions cellule-matrice** (Avraamides *et al.*, 2008)

### 3.2. Interactions entre cellules du cancer solide et cellules non néoplasiques

#### *3.2.1. Interactions des cellules tumorales avec les macrophages*

Outre la matrice extracellulaire, les cellules tumorales interagissent aussi avec les cellules non néoplasiques du microenvironnement. Les interactions entre les cellules tumorales et les macrophages TAM sont essentiels pour le développement de la tumeur (Figure 5). Les TAMs favorisent la néo-vascularisation, l'angiogenèse et la métastase. En effet, les cellules tumorales sécrètent des cytokines tels que VEGF, M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor) et des interleukines afin d'attirer les monocytes circulant vers la masse tumorale. Une fois arrivés dans le microenvironnement tumoral, les monocytes se différencient en TAM et entre en relation avec les cellules tumorales. Par la suite, les TAMs libèrent des MMPs qui sont importantes pour la dégradation de la matrice, en particulier MMP-2 et MMP-9 (Baay *et al.*, 2011). Ils sécrètent aussi certains facteurs de croissance comme VEGF, IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  et favorisent ainsi la croissance tumorale (Sica *et al.*, 2006).



**Figure 5 : Interactions entre TAMs et les cellules tumorales.**

### 3.2.2. Interactions des cellules tumorales avec les fibroblastes

Les fibroblastes associés au cancer (CAF) sont d'autres types de cellules non néoplasiques qui constituent la majorité du stroma tumoral et participent activement à la progression tumorale (Shimoda *et al.*, 2009). En produisant les composants de la MEC, les fibroblastes CAF peuvent déterminer les propriétés biophysique de la matrice et donc contrôler la motilité des cellules tumorales. Ils agissent comme un obstacle à l'infiltration des cellules immunitaires et aussi à l'accès aux médicaments anticancéreux dans les cellules tumorales (Maqzoub *et al.*, 2008). Par la suite, de nombreuses études ont montré une contribution des CAFs dans le développement tumoral, car ils sécrètent des cytokines et des facteurs de croissances spécifiques tels que SDF-1, PDGF, IL-6, COX-2, EGF, HGF et IGFs (Kalluri et Zeisberg, 2006) qui vont participer à créer un réseau de communication entre les CAFs et les cellules cancéreuses (Franco *et al.*, 2010). Récemment, une étude a montré que les CAFs du stroma d'un carcinome mammaire sur-expriment SDF-1 qui va jouer deux rôles en parallèle. D'une part, il recrute les progéniteurs endothéliaux

dans la tumeur pour favoriser l'angiogenèse et, d'autre part, il augmente la croissance de la tumeur à travers sa liaison sur son récepteur CXCR-4 exprimé sur la surface des cellules tumorales. D'autres études, réalisées sur différents types de cancer, ont montré que l'interaction des cellules tumorales avec CAFs est associée à une augmentation de l'expression des métalloprotéinases (MMPs) qui jouent rôle dans l'invasion et la progression tumorale. Cela se traduit par une surexpression de MMP-9 dans le cancer colorectal, favorisant ainsi la protéolyse matricielle ainsi qu'une augmentation de l'expression des MMP-1 et -3 dans des cellules issues d'un carcinome utérin (Sato *et al.*, 2004) et MMP-7 et -14 dans le cancer du sein (Tanaka *et al.*, 2003 ; Nguyen *et al.*, 2006).

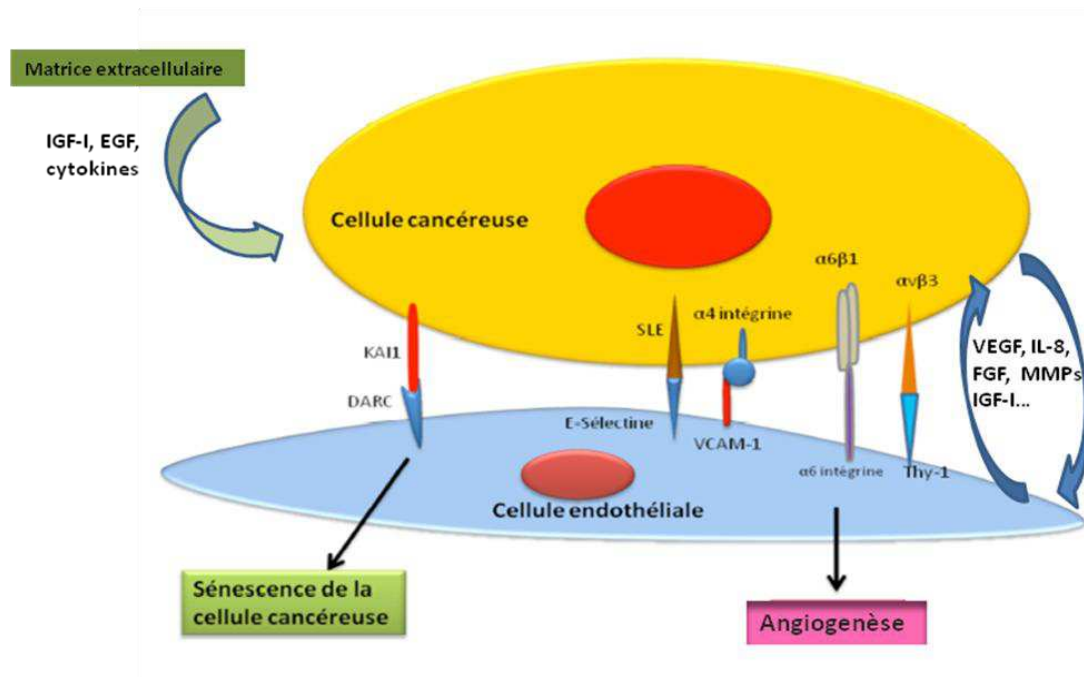
### 3.2.3. Interactions cellules tumorales et cellules endothéliales

L'interaction des cellules tumorales avec les cellules endothéliales est cruciale pour le développement de la tumeur et des métastases, et peut impliquer l'activation d'expression de molécules d'adhérences par les cellules endothéliales et les cellules tumorales (Figure 6). Fait intéressant, les cellules cancéreuses, par une voie paracrine, peuvent induire l'expression de protéines d'adhérence endothéliales. En effet, des études ont montré que les surnageants de milieu de culture des cellules cancéreuses stimulent l'expression, par les cellules endothéliales, de ces molécules. En outre, les cellules cancéreuses secrètent des cytokines comme le TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  ou INF- $\gamma$  qui vont directement activer les cellules endothéliales, ces dernières exprimant alors les molécules d'adhérences telles que E-sélectine, VCAM (kannagi *et al.*, 2004 ; narita *et al.*, 1999).

Il est admis que les molécules d'adhérences varient selon l'origine de la cellule cancéreuse et de la cellule endothéliale (Laferrière *et al.*, 2004). La molécule VCAM-1 est une protéine d'adhérence exprimée par les cellules endothéliales qui lie l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  fortement exprimée sur les cellules tumorales, comme celles présentes dans les mélanomes. La E-selectine qui n'est pas exprimée par les cellules endothéliales non activées, est cependant rapidement et transitoirement exprimée suite à des stimuli pro-inflammatoires. Son ligand potentiel est la glycoprotéine SLE (E-selectin ligand-1), exprimée par exemple dans le cancer du sein et du colon. Une étude sur les cellules endothéliales pulmonaires, exprimant une protéine de la famille des canaux chlorure-



calcium dépendants (mCICa-1), a montré la liaison de cette dernière avec l'intégrine  $\beta 4$ , exprimée par les cellules endothéliales, entraînant l'activation de FAK et la voie de signalisation ERK dans les cellules cancéreuses du sein (Abdel-Ghany *et al.*, 2002).



**Figure 6 : Interactions des cellules endothéliales et avec les cellules tumorales** (Mirshahi, 2010).

### 3.3. Interactions cellules leucémiques et microenvironnement tumoral

En plus des cancers solides, les leucémies interagissent également avec le microenvironnement tumoral. Les blastes expriment l'intégrine  $\alpha 4 \beta 1$  qui interagit avec la molécule d'adhérence VCAM-1 exprimée à la surface des cellules endothéliales. Les cellules leucémiques se lient aussi avec les cellules stromales médullaires. Cette interaction s'effectue entre VLA-4 et LFA-1, exprimés par les cellules tumorales, et leur ligand respectifs VCAM-1 et ICAM-1 exprimés par les cellules stromales. De plus, les cellules stromales favorisent la migration des cellules leucémiques en sécrétant SDF-1 $\alpha$  qui se lie à son récepteur CXCR4 (Ayala *et al.*, 2009). La matrice extracellulaire est un lieu de concentration de cytokines capables d'influencer l'hématopoïèse, ainsi que la survie et la prolifération des cellules leucémiques (Gordon *et al.*,

1990). Ces cytokines peuvent aussi jouer un rôle important dans la liaison des cellules au microenvironnement, comme le facteur des cellules souches SCF dont le récepteur est exprimé par la plupart des cellules leucémiques (Kanakura *et al.*, 2003).

Vu l'importance du microenvironnement et ses composants moléculaires dans le développement des cancers, nous avons voulu étudier un des facteurs de croissance, IGF-I sécrété par ce stroma tumoral et qui est très impliqué dans la croissance et la progression de certains cancers.

## II. L'axe IGF/IGF-R

Le système IGF (Insulin like Growth Factor) est composé de deux ligands, IGF-I et IGF-II, de deux récepteurs, IGF-IR et IGF-IIR, ainsi que de six IGFBP1-6 (IGF Binding Protein) qui régulent les ligands (Vorwerk *et al.*, 2002). En outre, certaines études suggèrent qu'un groupe de protéases de l'IGFBP appartient à la famille des IGFs parce qu'il régule indirectement l'action des IGFs en hydrolysant IGFBPs (Yu et Rohan, 2000). Ces protéases libèrent ainsi les IGFs liés aux IGFBPs et permettent à ces ligands d'agir avec IGF-IR et IGF-IIR. Il existe un groupe de protéases capable de réguler indirectement l'action des IGFs en hydrolysant IGFBP. Les IGFs, libérés des IGFBPs, sont alors capables de se lier à IGF1-R et IGF2-R.

### 1. La famille IGF

Les deux facteurs de croissance IGF-I et IGF-II sont des peptides d'environ 7,5 kDa qui partagent une similitude de 60% au niveau des acides aminés. Ils ont également un degré d'homologie important avec la pro-insuline et l'insuline, avec environ 40% de similitude au niveau de la séquence et de la structure. En effet, IGF-I, IGF-II et l'insuline proviennent du même gène ancestral commun.

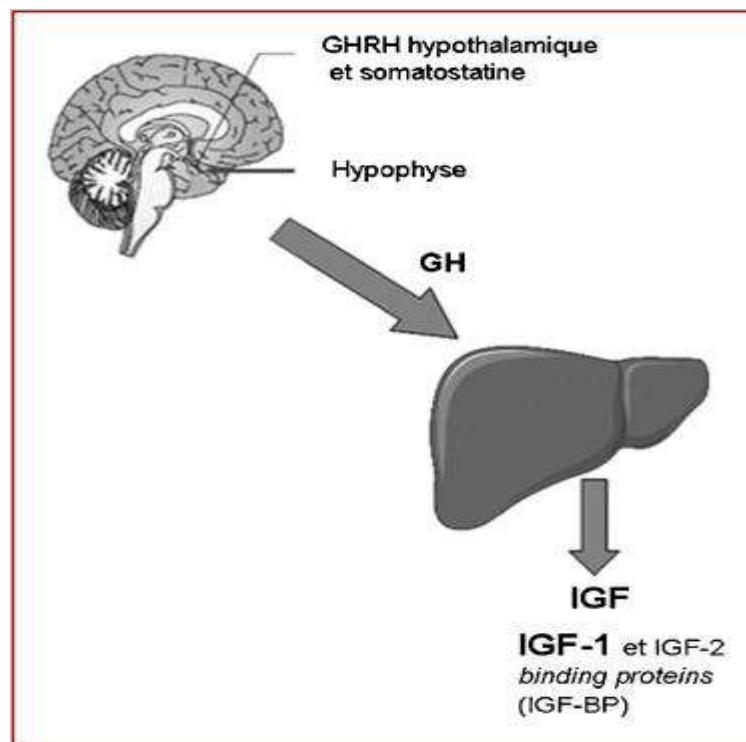
#### 1.1.L'IGF-I

IGF-I est un facteur de croissance constitué d'une simple chaîne de 70 acides aminés, synthétisé majoritairement dans le foie sous l'influence de l'hormone de croissance (GH) sécrétée par l'hypothalamus (Figure 7). Toutefois, une étude réalisée sur des souris dépourvues du gène codant IGF-I dans le foie n'a montré aucune différence au niveau de leur croissance par rapport aux souris sauvages (Scharf *et al.*, 2001 ; Yakar *et al.*, 1999). Ces résultats pouvaient être expliqués par la présence de l'IGF-I dans d'autres organes comme les reins, les muscles et les os, ce qui a été confirmé plus tard (LeRoith et Roberts, 2003). IGF-I exerce une fonction sur le développement post-natal (Wu et Zhu, 2011) en agissant de façon autocrine, paracrine ou

endocrine. A ce stade de développement, le niveau de l'IGF-I est faible mais il varie à la puberté où il augmente pour atteindre un pic, puis subit une diminution lente au cours de l'âge adulte.

## 1.2.IGF-II

IGF-II est un facteur de croissance de 67 acides aminés. Il est produit également dans le foie (Figure 7). Son niveau d'expression est abondant pendant le développement du fœtus mais diminue fortement au stade post-natal. A l'inverse d'IGF-I, l'expression de l'IGF-II est peu influencée par les hormones de croissance, et son taux circulant est plus élevé. Il possède une activité mitogénique pour un grand nombre de types cellulaires.



**Figure 7 : Régulation physiologique des IGFs** (Moro-Sibilot *et al.*, 2010).

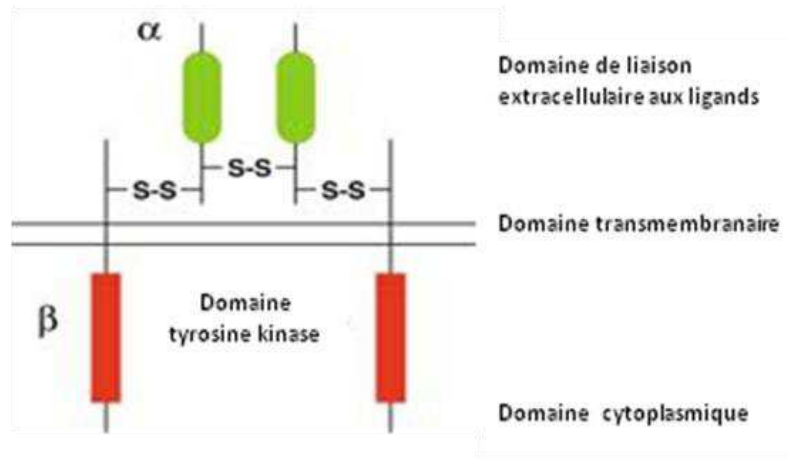
Les effets biologiques des protéines IGFs sur les cellules sont médiés *via* leurs liaisons aux récepteurs IGF-IR et IGF-IIR, mais aussi par l'intermédiaire du récepteur d'insuline. Le récepteur IGF-IR est structurellement similaire au récepteur de l'insuline mais différent d'IGF-IIR.

Il existe différents niveaux d'affinité entre les ligands IGFs et leurs récepteurs. On distingue :

- Une forte affinité entre la protéine IGF-I et le récepteur IGF-IR, et une très faible affinité avec IGF-II ;
- Une forte affinité entre IGF-II et son récepteur IGF-IIR par rapport à celle avec IGF-IR ;
- Les ligands IGF-I et IGF-II ont une très faible affinité avec le récepteur à l'insuline ;
- L'insuline ne se lie pas à L'IGF-IIR et très peu à l'IGF-IR.

### 1.3.IGF-IR

Le récepteur IGF-IR est un hétéro- tétramère avec une activité tyrosine kinase, composé de deux sous unités  $\alpha$  et deux sous unités  $\beta$  liées par des ponts disulfure. L'IGF-IR est différent des autres récepteurs à domaine tyrosine kinase. En effet, c'est un récepteur de structure dimérique qui ne nécessite pas de liaison avec son ligand. En revanche, les autres récepteurs à domaine tyrosine kinase ont besoin de se lier à leurs ligands pour se dimériser. L'IGF-IR possède une forte homologie de séquence (environ 60%) avec le récepteur à l'insuline, mais ils ont des fonctions distinctes. Le récepteur à l'insuline est impliqué dans la régulation du métabolisme des glucides, alors que l'IGF-IR a un rôle majeur dans le contrôle de la croissance et la prolifération des cellules. Les protéines IGFs se lient au récepteur IGF-IR au niveau du site de liaison situé dans les sous unités extracellulaires  $\alpha$ , ce qui va entraîner l'auto-phosphorylation du récepteur au niveau du domaine de la tyrosine kinase, localisée dans les sous unités transmembranaires  $\beta$  (Figure 8). L'auto- phosphorylation du récepteur va induire ensuite des voies de signalisation telles que PI3K-AKT et Ras-MAPK. L'activation de ces voies va entraîner des effets sur la cellule comme la prolifération, la migration, la survie et inhibition d'apoptose.



**Figure 8 : Structure schématique du récepteur IGF-IR**

#### 1.4. IGF-IIR

Le récepteur IGF-IIR, connu aussi sous le nom de l'IGF-IIR au mannose-6- phosphate, est beaucoup moins étudié. Sa structure est différente à celle de l'IGF-IR. Ce récepteur est une glycoprotéine transmembranaire de 250 kDa possédant 3 domaines : un domaine extracellulaire d'environ 147 acides aminés, impliqué dans sa liaison avec IGF-II, un domaine transmembranaire de 23 acides aminés et une partie C-terminale de 163 acides aminés. IGF-IIR lie IGF-II avec une forte affinité et IGF-I avec une très faible affinité. Comme son nom l'indique, IGF-IIR/M6P se lie également à des glycoprotéines contenant du mannose-6-phosphate, telles que des enzymes lysosomales et TGF- $\beta$  sous forme latente (Pavelic *et al.*, 2002). Ce récepteur est dépourvu de domaine tyrosine kinase et n'a pas de capacité à transduire de signal. Le principal rôle connu de ce récepteur est d'inhiber IGF-II. En effet, après sa liaison avec ce ligand, IGF-IIR séquestre et dégrade IGF-II et l'empêche ainsi d'activer le récepteur IGF-IR (Denley *et al.*, 2005).

	<i>Poids moléculaire (kd)</i>	<i>No. d'acides aminés</i>	<i>Localisation du gène</i>	<i>Taille du gène (kb)</i>	<i>No. d'exons</i>
<b><i>IGF1</i></b>	7.7	70	12q22-12q24	100	6
<b><i>IGF2</i></b>	7.5	67	11p15	30	9
<b><i>IGF1-R</i></b>	225	Sous unités $\alpha$ 706  Sous unités $\beta$ 626	15q25-15q26	100	21
<b><i>IGF2-R</i></b>	270	2450	6q25-6q27	140	Inconnu

**Tableau 1:** Caractéristiques moléculaires des membres de la famille IGF (Yu et Rohan, 2000).

### 1.5. Les IGFBP

Les IGFBPs ont des fonctions multiples et complexes ; elles sont capables d'inhiber ou d'amplifier l'action de l'IGFs, supprimant ou stimulant ainsi la prolifération cellulaire. Ces effets opposés de l'IGFBPs sur les IGFs sont déterminés par la structure des molécules liantes. Après leur liaison aux IGFs, IGFBPs jouent trois rôles majeurs : i) transporter les IGFs, ii) protéger les IGFs de la dégradation iii) réguler l'interaction entre IGFs et IGF1-R. Normalement, les IGFBP fixent IGF-I et IGF-II avec une affinité plus importante que celle entre les deux ligands et IGF1-R. L'affinité peut varier selon le type de l'IGF-BP impliqué. Par exemple, IGFBP-3, bloque l'interaction entre les ligands et le récepteur IGF1-R et supprime donc l'action des IGFs sur la cellule (Kelley *et al.*, 1996 ; Collett-Solberg et Cohen, 1996). Les six IGFBPs agissent sur la biodisponibilité des IGFs et, par là même, diminuent l'influence des voies de signalisations dans lesquelles les IGFs sont impliqués.

## 2. Rôle physiologique et biologique du système IGF/ IGF-R

A la naissance, les IGFs sont sécrétés par le foie sous l'effet des hormones de croissance. Une fois dans la circulation, les IGFs sont associés à des IGF-BP qui vont les stabiliser et les conduire vers les tissus cibles afin d'exercer des effets divers tels que la stimulation de la synthèse des protéines, la prolifération, la reproduction et la survie des cellules. IGF-I est aussi connu pour être un inhibiteur de l'expression de l'hormone de croissance GH par l'hypophyse. En effet, cette hormone possède un rôle antagoniste à l'insuline en favorisant la gluconéogenèse et la lipolyse et ainsi augmente le taux de la glycémie. L'inhibition de GH par IGF-I entraîne indirectement un blocage des actions inhibitrices de l'insuline par cette hormone. IGF-I et IGF-II jouent différentes fonctions biologiques dans l'organisme à travers IGF-IR, comme le développement fœtal et la croissance postnatale, la régulation du métabolisme de la masse osseuse et l'homéostasie des tissus adipeux. De plus, IGF-I stimule l'adipogenèse de manière autocrine et paracrine par l'activation de la voie PI3K et améliore la maturation des pré-ostéoblastes en ostéoblastes (Kawai et Rosen, 2010).

### 2.1. La transduction du signal de l'IGF-IR

Lors de l'activation du récepteur IGF-IR, la tyrosine kinase intrinsèque du récepteur est activée, et va par la suite provoquer une autophosphorylation des résidus tyrosines du domaine intracellulaire situé dans la sous-unité  $\beta$  du récepteur. Une fois phosphorylée, la tyrosine 950, localisée dans la partie juxta-membranaire du récepteur, va servir de site d'ancrage à des protéines adaptatrices telles que Shc et IRS. Ces substrats servent à engager des cascades de phosphorylation PI3K et MAPK et ainsi induire la différenciation et la prolifération cellulaire (LeRoith et Roberts, 2003 ; Vatten *et al.*, 2002). Actuellement, il existe 4 types de protéines IRS (IRS-1 à IRS-4), qui diffèrent par leurs distributions tissulaires. Les effets de l'IRS-1 et -2 sont différents de ceux de l'IRS-3 et -4. Les IRS-1 et -2 sont les protéines adaptatrices les plus connues et essentielles pour l'activation de IGF-IR. Les deux protéines IRS et Shc activent les voies PI3K, qui va à son tour va recruter d'autres substrats tels que l'AKT. AKT phosphorylée va favoriser l'activation de l'expression des protéines anti-apoptotique, comme Bcl-2 et l'inactivation de la protéine pro-apoptotique Bad. En parallèle à la voie de PI3K, les IRS-1, -2 et Shc phosphorylées recrutent



Grb2/SOS qui va à son tour activer Ras et la voie MEK-ERK, entraînant ainsi la prolifération des cellules. La signalisation d'IGF-IR est régulée par des protéines impliquées dans la déphosphorylation telles que PTEN, SHP2 et SHIP (Chitnis *et al.*, 2008) (Figure 9).

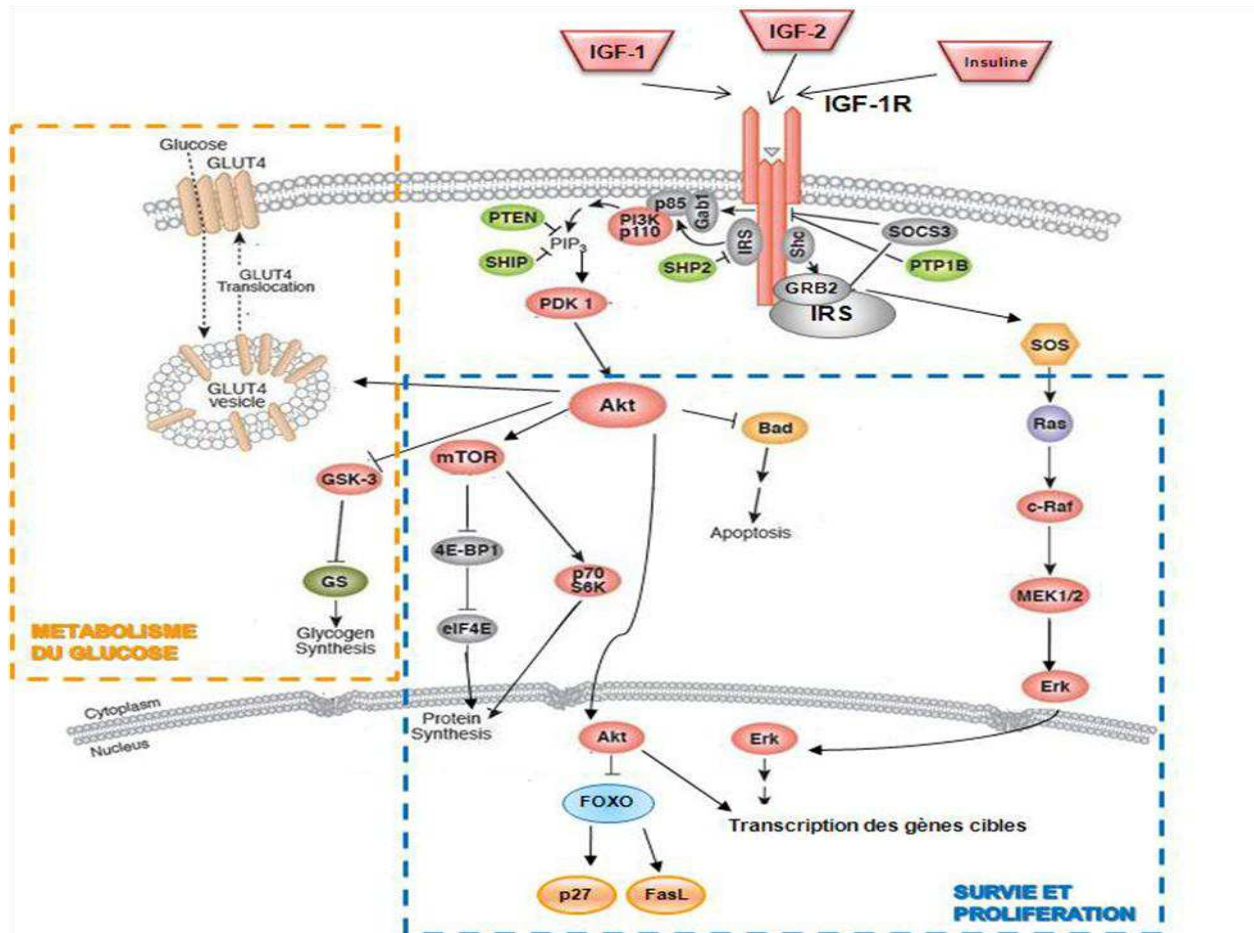


Figure 9 : Les voies de signalisation du récepteur IGF-I (Dupont *et LeRoith*, 2001).

## 2.2. Les voies de signalisations du système IGF/ IGF-IR

Il existe deux voies de signalisation majeures activées par IGF-IR, la voie de PI3K et la voie de MAPK.

### 2.2.1. La voie de signalisation PI3K

L'activation de PI3K conduit à de multiples voies de signalisation intracellulaire qui régulent les fonctions telles que le métabolisme, la croissance, la survie et la prolifération cellulaire ainsi que l'inhibition de l'apoptose (Engelman *et al.*, 2006). Une fois activée, la PI3K se lie à l'AKT. A ce stade, l'AKT est activée, et à son tour, elle phosphoryle et inactive plusieurs protéines impliquées dans le processus d'apoptose comme la Bad. Cette molécule, à son état non phosphorylé, interagit avec la protéine Bcl-2 et l'empêche d'exercer ses fonctions anti-apoptotique. Dans son état phosphorylé, Bad est incapable d'interférer avec Bcl-2 et forme un complexe avec les protéines chaperonnes 14-3-3 dans le cytosol. De même, les facteurs de transcriptions FOXOs sont phosphorylés et inactivés par AKT, bloquant ainsi la transcription de gènes pro-apoptotiques comme Fas ligand, Bim, p27<sup>Kip1</sup>, p21<sup>Cip1</sup>. Une fois phosphorylées, les protéines FOXOs sont exportées vers le cytoplasme *via* les protéines 14-3-3 où elles sont dégradées par le protéasome (Greer et Brunet, 2005). L'AKT phosphoryle aussi le facteur de transcription CREB qui a un rôle dans la régulation des gènes anti-apoptotiques. De plus, l'AKT peut bloquer le déclenchement de la cascade des caspases, protéine impliquée dans l'apoptose, en phosphorylant et inactivant la caspase 9. L'AKT joue un rôle dans la croissance cellulaire par l'activation de mTOR. En effet, l'activation de mTOR induit une phosphorylation accrue de la Kinase p70S6 qui contrôle la synthèse des protéines impliquées dans le cycle cellulaire (Inoki *et al.*, 2002). Par ailleurs, l'activation d'AKT joue un rôle important dans le métabolisme du glucose. Elle inhibe la synthèse du glycogène en inactivant la protéine GSK-3 et favorise l'entrée du glucose en entraînant la translocation de GLUT4, une protéine impliquée dans le métabolisme des glucides à la membrane (figure 9).

### 2.2.2. La voie de signalisation de MAPK

Le récepteur IGF-IR est également activé par une autre voie de signalisation, la voie MAPK. Elle induit la différenciation et la migration cellulaire mais aussi la régulation des processus d'apoptose. Cette voie est initiée par le recrutement du complexe Grb2/Sos par Shc et IRS phosphorylés. Ce complexe actif alors Ras et induit une cascade de phosphorylations successives. En effet, Ras activée recrute au niveau de la membrane Raf, qui va ensuite induire

l'activation par phosphorylation de la MEK. La MEK active par double phosphorylation ERK 1/2, ce qui entraîne sa translocation au niveau du noyau et provoque l'activation de la transcription des gènes codant des facteurs de transcriptions tels que c-FOS et c-JUN, impliqués dans l'initiation du cycle cellulaire et la croissance cellulaire (Ramos, 2008).

### 2.2.3. Interconnexion entre MAPK et PI3K

Il est admis actuellement, qu'il existe un lien étroit entre la voie de signalisation PI3K et la voie MAPK. Plusieurs études ont montré que l'inhibition de PI3K empêche la stimulation de ERK 1/2 par le récepteur IGF-1R dans certains types de cellules (Rubio et Wetzker, 2000). De plus, dans certains types de cellules exprimant abondamment le récepteur IGF-1R et stimulés par une forte dose du ligand IGF-I, on observe une activité d'AKT persistante qui induit l'inactivation de Raf et ensuite une diminution de l'activité d'ERK (Moelling *et al.*, 2002). Dans ce cas, la PI3K ne devient plus nécessaire pour l'activation d'ERK.

Une autre interconnexion entre les voies de signalisation MAPK et PI3K a été observée. Celle-ci joue un rôle important dans des fonctions cellulaires, notamment la régulation de la croissance et la survie cellulaire, et est ainsi souvent associée avec la progression tumorale. Le lien entre les deux voies se fait par l'intermédiaire de Ras (Figure 10). Des travaux ont révélé que la PI3K co-immunoprécipite avec Ras, indiquant qu'elle peut agir directement en tant que répresseur ou activateur de Ras (Sjolander *et al.*, 1991).

De plus, des membres de la famille PKC peuvent jouer également un rôle d'intermédiaires entre la voie PI3K et la voie Ras/MAPK. La PI3K active la PKC et induit ainsi l'activation par la phosphorylation de Ras (Naranatt *et al.*, 2003; Schonwasser *et al.*, 1998). Cependant, les interconnexions entre la voie PI3K et la voie Ras/MAPK restent controversées et varient selon le type de cellules et de ligand.



### 3. IGF/IGF-IR dans les cancers

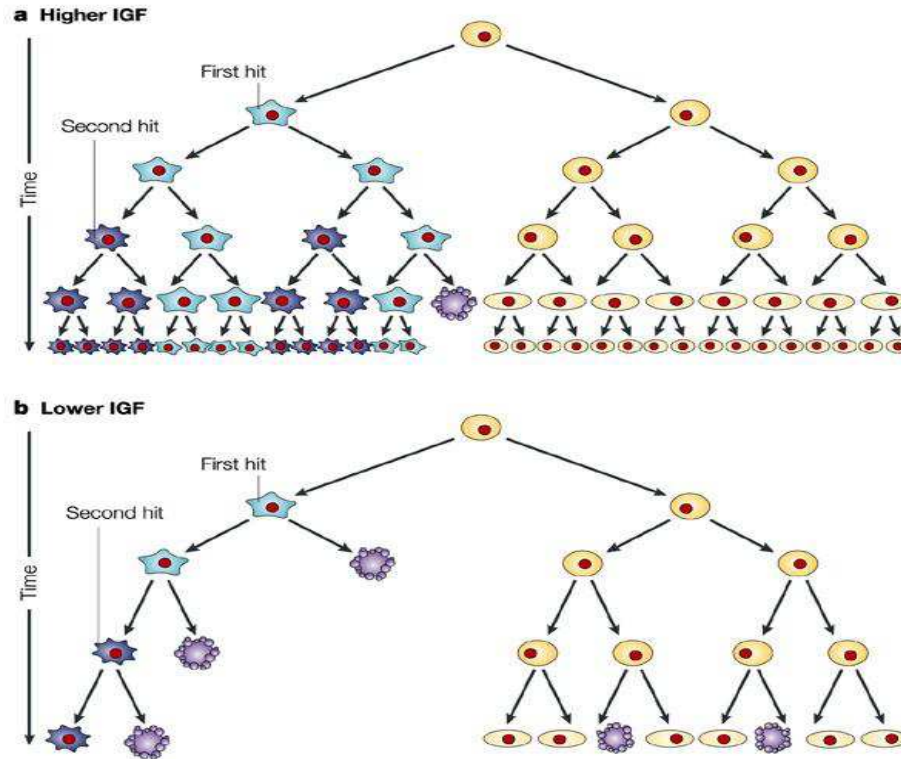
#### 3.1. Généralité

Il est admis actuellement et après plusieurs études que le système d'IGF est impliqué dans le développement des cancers à travers l'activation des voies de signalisation de PI3-K/AKT et Ras/MAPK en favorisant la survie, la prolifération et la croissance des cellules tumorales et l'inhibition d'apoptose.

##### - *IGF-I*

Dans les années 90, il a été mis en évidence l'implication du facteur de croissance IGF-I dans le développement des tumeurs. Plusieurs études ont montré qu'un taux élevé de la concentration sérique de l'IGF-I est associé à un risque accru d'une large gamme de cancers, comme le cancer du poumon, du colon, de la prostate et du sein (Yang et Winslet, 2011). Une autre étude sur des modèles animaux a montré une réduction de la croissance des cellules cancéreuses du colon ainsi que la fréquence de formation des métastases chez des souris déficientes en IGF-I hépatique (un faible niveau de l'IGF-I circulant) (Wu *et al.*, 2002). En revanche, l'administration de l'IGF-I dans ces souris augmente la croissance tumorale et la formation des métastases (Wu *et al.*, 2003).

Le facteur de croissance IGF-I est produit essentiellement par le foie, en réponse à la GH, mais aussi par les autres tissus et agit de manière autocrine et/ou paracrine et/ou endocrine. Il est également produit par les cellules tumorales (Pollak *et al.*, 2004). En outre, la croissance des tumeurs, médiée par IGF-I, est dépendante, d'une part, de l'environnement ou de l'apport de l'IGF-I dans la circulation sanguine et, d'autre part, de la capacité des cellules tumorales à produire IGF-I. Ce dernier stimule la prolifération et la croissance des tumorales (figure 11). Parallèlement, il inhibe l'apoptose et favorise la survie de cellules cancéreuses ayant accumulé des dommages génétiques au cours du processus de la cancérogenèse (Pollak *et al.*, 2004).



**Figure11 : L'influence de signalisation de IGF dans l'oncogénèse (Pollak *et al.*, 2004).**

#### - IGF-II

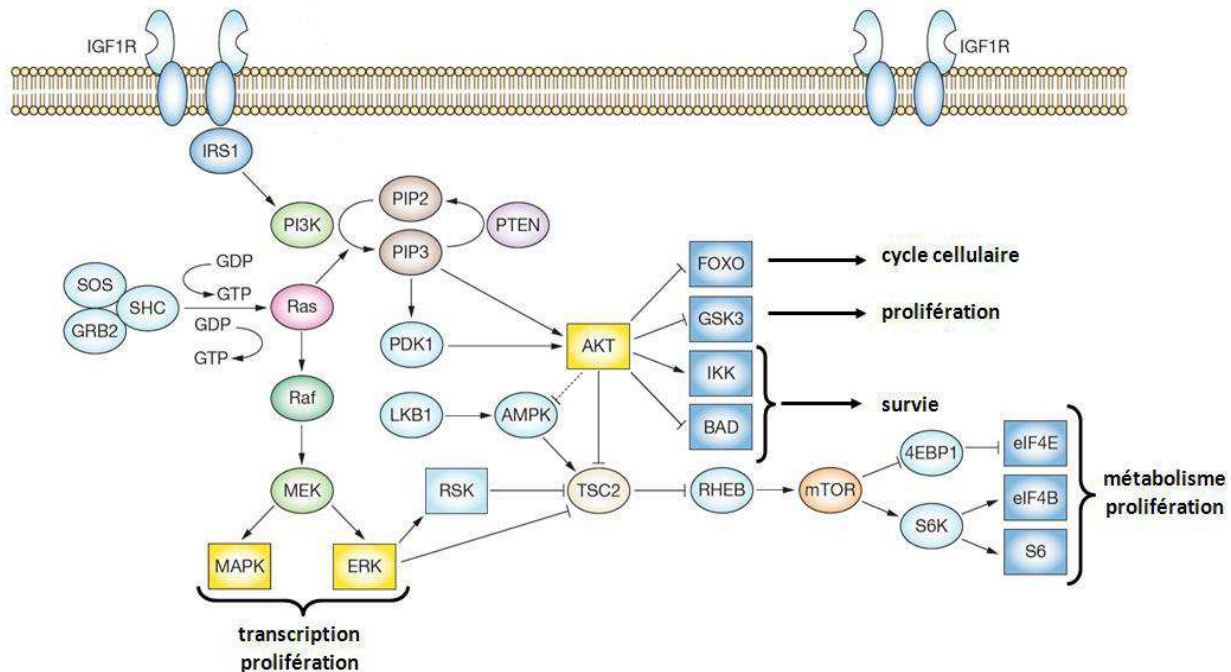
Le peptide IGF-II est également produit par le foie et par les tissus extra-hépatiques. Son taux dans la circulation sanguine est plus élevé de celui de l'IGF-I. Il est décrit comme un facteur de croissance qui a un rôle dans la phase prénatale et le développement de l'organisme. L'ARNm d'IGF-II et sa protéine sont surexprimés dans certains cancers (Yballe *et al.*, 1996 ; Wu *et al.*, 1997). Ces résultats montrent qu'IGF-II peut être impliqué également dans le processus de transformation des cellules épithéliales et la formation des tumeurs comme le cancer de la prostate, du poumon, du sein et du gliome (Kim *et al.*, 1998). Cependant, une étude sur différents modèles animaux a montré que la surexpression de l'IGF-II n'est pas suffisante pour induire le phénomène de transformation maligne, mais IGF-II exerce un effet pro-tumoral pendant les phases tardives de développement de certains cancers (Toretzky et Helman, 1996), ce qui le différencie du rôle de l'IGF-I.

IGF-II se fixe sur les deux récepteurs IGF-IR et IGF-IIR. A l'inverse d'IGF-IR, IGF-IIR ne possède pas d'activité tyrosine kinase. Il séquestre IGF-II après leur liaison pour le dégrader.. Cela limite la sollicitation du récepteur IGF-IR par IGF-II puisque ce dernier est dégradé par IGF-IIR. Plusieurs études ont mis en évidence l'implication d'IGF-IIR dans les cancers où il jouerait un rôle de suppresseur de tumeurs (O'Gorman *et al.*, 2002).

### 3.2. Les voies de signalisations de l'IGF-IR impliquées dans le cancer

La majorité des effets des ligands IGF sur les cellules tumorales sont transmis *via* leur liaison au récepteur IGF-IR qui va, par la suite, induire une activation des voies de signalisation. La voie de signalisation d'IGF-I est impliquée dans la progression des tumeurs. IGF-I est surexprimé dans plusieurs cancers tels que les cancers du colon, du sein, du mélanome et du pancréas (Tao *et al.*, 2007). L'activité du récepteur IGF-IR entraîne l'activation des voies PI3K/AKT et Ras/MAPK qui stimulent la croissance, la survie et le métabolisme cellulaire ainsi que la progression du cycle cellulaire et l'inhibition d'apoptose. En effet, Ras est impliqué dans la régulation de la prolifération des cellules tumorales en stimulant de façon active certains facteurs de transcription. AKT contrôle la survie, le cycle cellulaire et la prolifération des cellules à travers la phosphorylation des substrats et l'activation de mTOR. De plus, ces deux voies de signalisation actives s'interconnectent entre elles et activent ainsi mTOR qui joue un rôle important dans la croissance des tumeurs (Figure12). Le rôle de l'IGF-IR dans le phénomène de transformation maligne des cellules tumorales est donc important. La voie de l'IGF-IR stimule également l'adhérence cellulaire des tumeurs, la migration et l'invasion par activation de la protéine RACK1. En effet, cette protéine est impliquée dans la progression des tumeurs par les actions des protéines kinases et sa capacité à interagir avec les intégrines. Certaines études ont confirmé l'implication d'IGF-IR dans la progression de certains cancers. En effet, l'inhibition d'IGF-IR par un anticorps anti-IGF-IR induit une forte diminution de la prolifération des cellules du cancer du mélanome, du sein et du colon (Werner et LeRoith, 1996). En outre, une étude a montré qu'IGF-I protège les cellules du cancer du colon du facteur de nécrose tumorale (TNF), inducteur d'apoptose, en activant une combinaison de deux voies de transductions MAPK et NF- $\kappa$ B (Remacle-Bonnet *et al.*,

2000). L'IGF-IR est impliqué également dans l'activation de la voie de signalisation de STAT3, essentielle dans le processus de développement des tumeurs.



**Figure 12 : Les voies de signalisations IGF-1R** (Tao *et al.*, 2007)

### 3.3. Les régulateurs de la voie IGF-/IGF-IR

#### 3.3.1. IGFBP

Les actions de l'IGF sont modulées par une famille de facteurs IGFBP (IGF Binding Protein). La famille IGFBP est composée de six facteurs qui se lient aux peptides IGFs avec différentes affinités (Samani *et al.*, 2007). Les IGFBP-1 à -5 se lient préférentiellement à IGF-I alors qu'IGFBP-6 a plus d'affinité pour IGF-II (Meinbach et Lokeshwar, 2006). Ils sont exprimés de manière ubiquitaire et sont localisés au niveau de la circulation et des parties extracellulaires. Les IGFBP jouent un rôle important dans la bioactivité et la biodisponibilité des IGFs (Jones et Clemmons, 1995). En effet, les IGFBP peuvent amplifier les effets de l'IGF en assurant son



transport de la circulation vers les tissus, près de son récepteur, comme c'est le cas pour IGFBP-1, -2, et- 4. Cependant, dans la plupart des cas, ils l'inhibent en le séquestrant et l'empêchent de se lier à son récepteur, ce qui inhibe la mitogenèse, la différenciation et la survie des cellules. IGF-BP 3 est plus particulièrement le facteur prédominant dans la circulation ; c'est la protéine de la famille IGFBP la plus étudiée dans le cancer. Son principal rôle est de maintenir le réservoir de l'IGF dans la circulation en formant un complexe avec ce ligand (70 à 80% des taux sanguins de l'IGF). Les IGFBP ont également des activités indépendantes de l'IGF à travers leurs liaisons avec d'autres molécules. Par exemple, IGFBP-1 se lie à l'intégrine  $\alpha 5 \beta 1$ , responsable de l'adhésion et de la motilité des cellules (Jones *et al.*, 1996). IGFBP-3 a, lui, deux modes d'action : soit il se fixe sur des récepteurs cellulaires spécifiques, soit il peut être transloqué dans le noyau d'une cellule où il va interagir avec des facteurs de transcription, tels que le récepteur de rétinoïde X (RXR- $\alpha$ ) (Liu *et al.*, 2000), et provoquer ainsi l'apoptose et l'inhibition de la prolifération cellulaire. Comme évoqué précédemment, le taux sérique élevé de l'IGF-I est associé à une augmentation du risque de multiples cancers, tels que le cancer du sein et de la prostate. En revanche, le taux élevé de l'IGFBP-3 circulant est corrélé à une diminution du risque des cancers (Pollak *et al.*, 2004).

### 3.3.2. *PTEN*

PTEN est connu pour être un gène suppresseur de tumeurs et un régulateur de l'activité d'IGF-IR (Li et Sun, 1997). C'est un gène codant pour une phosphatase qui peut être impliquée dans le contrôle du développement de cancers et de la régulation du cycle cellulaire. Plusieurs études ont montré qu'une perte d'expression de PTEN est observée dans de multiples cancers, tels que le glioblastome, le cancer du sein et de la prostate (di Cristofano et Pandolfi, 2000), car elle provoque une forte activité de PI3K, liée à l'activation d'IGF-IR, et donc une augmentation de la prolifération cellulaire et des activités anti-apoptotiques.

### 3.3.3. *Autre Phosphatases*

Il existe d'autres phosphatases qui jouent un rôle dans la régulation de l'activité d'IGF-IR, en plus de PTEN : SHIP-2 et PTP-1B. SHIP-2 est une phosphatase lipidique, impliquée dans la

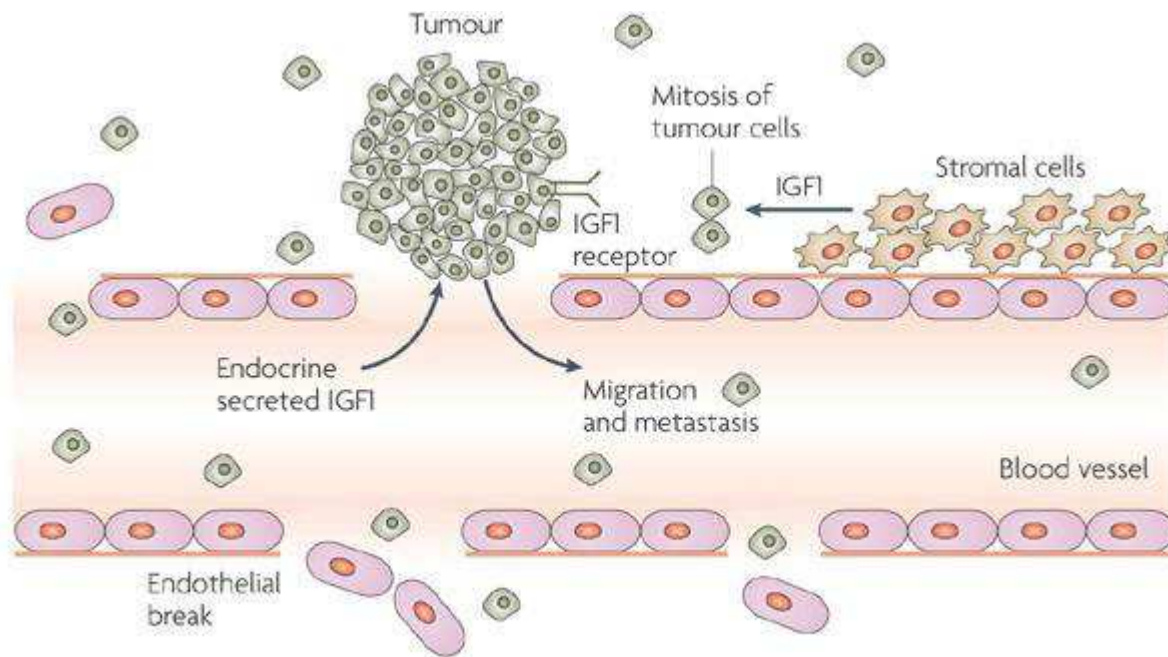
régulation de la voie IGF-IR et conduisant à l'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses dans certaines conditions.

Des études ont montré que SHP-2 peut provoquer des effets positifs ou négatifs sur la voie de signalisation d'IGF-IR. En effet, SHP-2 déphosphoryle IGF-IR, ce qui va entraîner une inhibition de la voie de signalisation de celui-ci, médiée par PI3K. Cependant, les résultats montrent également un renforcement de la transduction du signal par la MAPK (Maile *et al.*, 2003). La protéine tyrosine phosphatase 1B (PTP-1B) est également impliquée dans la déphosphorylation du récepteur IGF-IR et l'inhibition de sa voie de signalisation.

Plusieurs études ont montré que le taux sérique d'IGF-I est augmenté dans plusieurs types de cancers et confirme son implication dans le développement des tumeurs. Vu l'importance d'IGFI et IGF-IR dans le cancer, et en se basant sur des données bibliographiques, nous allons détailler l'effet du complexe IGF-I/IGF-IR dans l'oncogenèse.

### 3.4. Le rôle de l'IGFI-IGF-IR dans la cancérogenèse

Le processus de cancérogenèse est un phénomène très complexe, qui se produit en plusieurs étapes (l'initiation, la promotion, et la progression), induisant la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse. Cette dernière est caractérisée par sa multiplication anarchique, son indépendance vis-à-vis des facteurs qui régulent sa croissance, sa capacité à échapper au processus de la mort cellulaire programmée, sa capacité d'invasion en provoquant le processus de néoangiogenèse et enfin la formation de métastases. IGF-I joue un rôle primordial dans les différentes étapes de progression de cancer. Il peut être exprimé par les cellules stromales ou les cellules tumorales du microenvironnement. IGF-I agit d'une façon autocrine, paracrine ou endocrine sur les cellules exprimant son récepteur IGF-IR (Figure 13).



**Figure 13 : Les actions de l'IGF1 dans les différentes étapes du développement tumoral**  
(Clemmons *et al.*, 2007)

### 3.4.1. Rôle de l'IGF-I dans la croissance et la prolifération tumorale

Les tumeurs sont généralement caractérisées par une croissance cellulaire progressive qui est définie par une prolifération cellulaire anarchique et indépendante vis-à-vis des signaux de prolifération pré-requis, par une augmentation de la survie des cellules et par une résistance au processus d'apoptose. La prolifération incontrôlée des cellules tumorales est accompagnée d'une perte d'inhibition de contact et d'une insensibilité aux signaux antiprolifératifs. La dérégulation de la prolifération des cellules cancéreuses est liée à différents mécanismes tels que la mutation, une production autocrine des facteurs de croissance et leur surexpression par le microenvironnement tumoral. Ce phénomène va provoquer une stimulation autocrine de la prolifération cellulaire, une activation constitutive des récepteurs des facteurs de croissance et ainsi la stimulation des voies de signalisations. D'autres mécanismes sont également connus pour être liés à la croissance tumorale comme la mutation du gène de sénescence *P53* ou l'inactivation des inhibiteurs des kinases cycline-dépendantes (Cdk).

### *a. Cycle cellulaire*

Le cycle cellulaire est un ensemble de phase que traverse une cellule entre sa formation par division, à partir d'une cellule mère, et le moment où cette cellule a fini de se diviser en deux cellules filles. Ce système est hautement régulé par plusieurs protéines, essentiellement des (Cdk), et par des facteurs de croissance qui interviennent dans la surveillance du cycle cellulaire en régulant l'activité des Cdks. La plupart de temps, les cellules tumorales produisent beaucoup d'IGF-I qui contribue à la prolifération rapide des cellules tumorales par régulation progressive du cycle cellulaire, en agissant sur ses points de contrôle (Figure14). En effet, IGF-I facilite l'entrée dans le cycle cellulaire et joue un rôle dans la transition du stade G1 au stade S. Pour cela, il augmente l'expression de la cycline D1 et de la Cdk4 et, par conséquent, la phosphorylation de la protéine du rétinoblastome et la libération du facteur de transcription E2F (Résenthale et Cheng, 1995 ; Dupont *et al.*, 2000). En outre, IGF-I peut baisser l'activité de la protéine issue de la famille Cdk inhibiteurs (Cdk<sub>i</sub>), P27, ou modifier sa localisation nucléaire par l'intermédiaire de la voie PI3K/AKT (Coats *et al.*, 1996). Cependant, plusieurs études montrent que le rôle de l'IGF-I dans le cycle cellulaire est dépendant du type cellulaire. En effet, une étude portant sur la lignée cellulaire d'adénocarcinome du colon A549 a montré qu'une stimulation continue de l'IGF-I induit une importante expression de P21 *via* la voie de PI3K et provoque ainsi une diminution de la croissance cellulaire (Kodama *et al.*, 2002).

Une étude de Dupont *et al* (2003) sur une lignée cellulaire issue du cancer du sein non métastatique MCF7 a montré qu'IGF-I augmente l'expression de P21 (Cdk<sub>i</sub>) par la voie ERK1/2. Toutefois, l'inhibition de P21, par un ARN anti-sens, provoque une diminution de la prolifération cellulaire induite par IGF-I et, par conséquent, agit sur le blocage de la transition de la phase G1 en phase S. P21 joue, dans ce cas, un rôle d'inducteur de la progression du cycle cellulaire plutôt qu'un rôle d'inhibiteur.

IGF-I peut également exercer un rôle dans la transition G2/M. En effet, IGF-I augmente, dans les cellules d'ostéosarcome MG63, l'expression de cycline B1 et Cdk 2, en plus de la cycline D1, mais à des moments antérieurs (Furlanetto *et al.*, 1994). L'ensemble des résultats antécédents montrent qu'IGF-I peut contrôler, de façon positive, la progression du cycle cellulaire au niveau de

plusieurs stades, mais essentiellement au niveau de la transition G1/S *via* les voies PI3K/AKT ou ERK1/2.

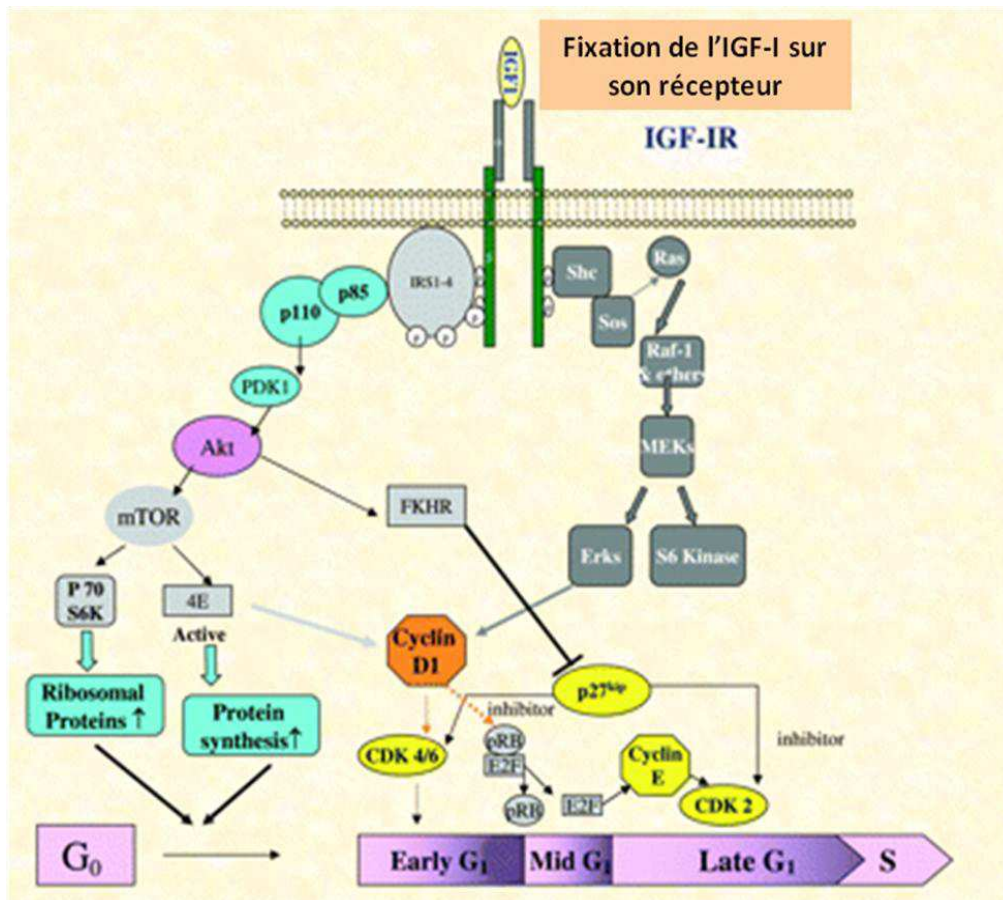


Figure14 : Rôle de la voie de signalisation de IGF-IR dans le cycle cellulaire (Samani *et al.*, 2006)

#### *b- Survie et apoptose*

L'apoptose, ou mort programmée, est un phénomène actif d'autodestruction cellulaire qui se produit dans des conditions physiologiques et pathologiques, et qui permet d'éliminer d'anciennes cellules, ayant accumulé des altérations. Le contrôle de ce phénomène est assuré par de nombreux gènes, tels que P-53 et bcl-2. Le processus d'apoptose, qui joue un rôle essentiel dans

l'homéostasie, passe par deux voies distinctes : intrinsèque (voie mitochondriale) et extrinsèque (voies des récepteurs de mort) (Figure 15).

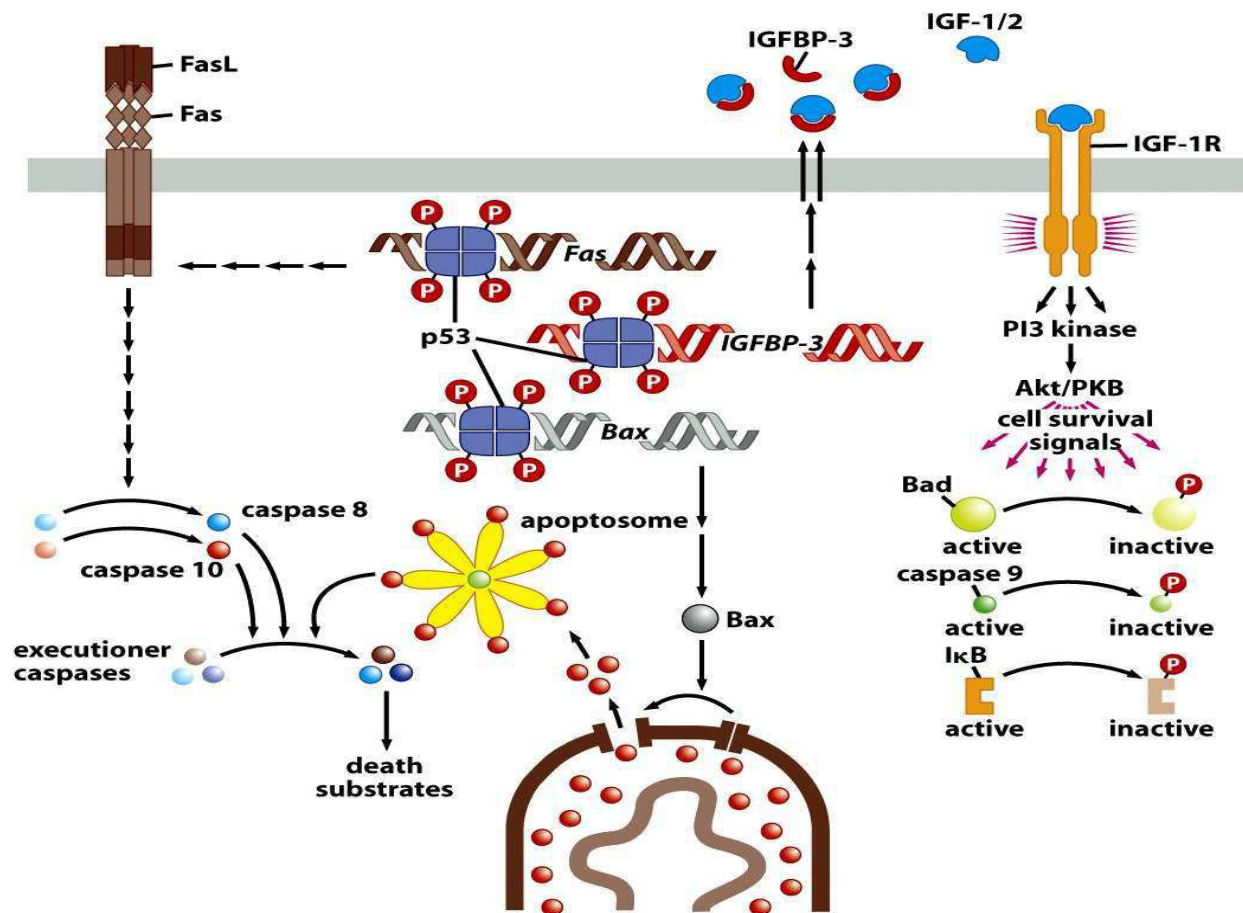
La première voie s'active à l'intérieur des cellules suite à une stimulation par des facteurs de stress tels que les lésions causées à l'ADN ou le stress oxydatif. Le facteur de transcription P53, qui joue un rôle important dans la régulation de la voie de signalisation d'apoptose, va activer la transcription des gènes pro-apoptotiques Bad, Bax, Bak, Bim etc. Les protéines pro-apoptotiques vont ensuite favoriser la perméabilisation de la membrane mitochondriale en creusant des pores au niveau de la membrane et permettre ainsi le relargage du cytochrome c dans le cytoplasme. Le cytochrome c se lie alors avec à la protéine Apaf-1 (Apoptosis protease activating factor) et forme avec elle un complexe appelé apoptosome, responsable du clivage et de l'activation de la pro-caspase-9 qui devient caspase-9. Cette protéine va activer à son tour d'autres caspases, -3, -6 et -7, impliquées dans la dégradation des protéines du métabolisme et du cytosquelette, ce qui entraîne la mort de la cellule (Oberst *et al.*, 2008).

Le mécanisme d'apoptose est régulé par certaines protéines telles que Bcl-2 ou Bcl-x1, qui agissent comme des inhibiteurs. Ces protéines ont le pouvoir de contrôler la perméabilisation de la membrane de la mitochondrie en inhibant l'ouverture des canaux mitochondriaux (Chipuk *et al.*, 2004).

La voie d'activation d'apoptose extrinsèque est déclenchée suite à la liaison d'un facteur sécrété par le microenvironnement sur son récepteur. Les facteurs concernés sont TNF- $\alpha$ , Fas ligand et la cytokine TRAIL (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand) qui viennent se fixer sur leur récepteur de mort, présents à la surface cellulaire (récepteur Fas/CD45 ou DR4, le récepteur associé à TRAIL). Cette fixation va entraîner une cascade de signalisations qui vont activer certaines caspases (caspases-8 et -10) de manière indépendante de l'apoptosome (Wallach *et al.*, 2008). La protéine P53 contrôle la voie extrinsèque de manière indirecte. En effet, P53 peut induire la surexpression des récepteur Fas et DR4 présents à la surface de la cellule. En plus de ces protéines, P53 régule l'expression de l'IGFBP-3 en induisant son expression par les cellules. En effet, IGFBP-3 sécrété par la cellule va se lier à l'IGF-I et l'empêcher de se fixer sur son récepteur IGF-IR (Butt & Williams, 2001) (Figure 15).

Dans le tissu tumoral, les cellules cancéreuses transformées acquièrent la capacité d'échapper à l'apoptose de plusieurs manières : perturber l'équilibre des protéines pro et anti-apoptotiques, réduire l'activité des caspases et altérer les voies de signalisation des récepteurs de mort. Par conséquent, dans les cellules cancéreuses, l'IGF-I est connu non seulement pour son rôle actif dans la survie des cellules, mais également dans l'inhibition d'apoptose *via* son récepteur l'IGF-IR. L'activation de ce dernier va stimuler la voie d'AKT, qui va à son tour phosphoryler la pro-caspase-9, empêchant ainsi son clivage protéolytique, nécessaire à la formation de la caspase-9 active. Par ailleurs, l'IGF-I régule positivement l'expression des protéines anti-apoptotiques telles que Bcl-xl *via* l'activation de la voie de signalisation PI3K/AKT. Cette dernière est impliquée dans l'inactivation des caspases, en particulier la caspase-9, et dans l'inhibition d'apoptose (Parrizas et LeRoith, 1997) (Figure15).

La voie de signalisation de l'IGF-IR, activé par son ligand IGF-I, empêche également la dégradation de la  $\beta$ -caténine cytoplasmique, provoquant ainsi le maintien de sa liaison avec la molécule d'adhérence membranaire E-cadhérine et les jonctions cellule-cellule. De plus, l'IGF-I, par l'activation de la voie MAPK, est impliqué dans l'inactivation de la P53.(Heron-Milhavet et LeRoith, 2002). L'activation de ces mécanismes permet d'assurer la survie des cellules tumorales.

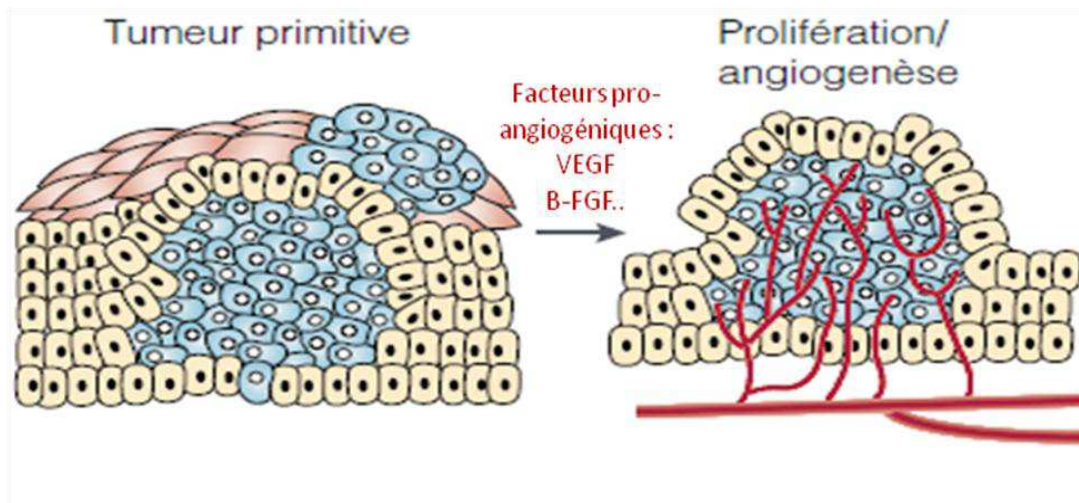


**Figure 15 : Les deux voies d'activation de l'apoptose et la régulation par IGF (Weinberg, 2007).**

### 3.4.2. Angiogenèse

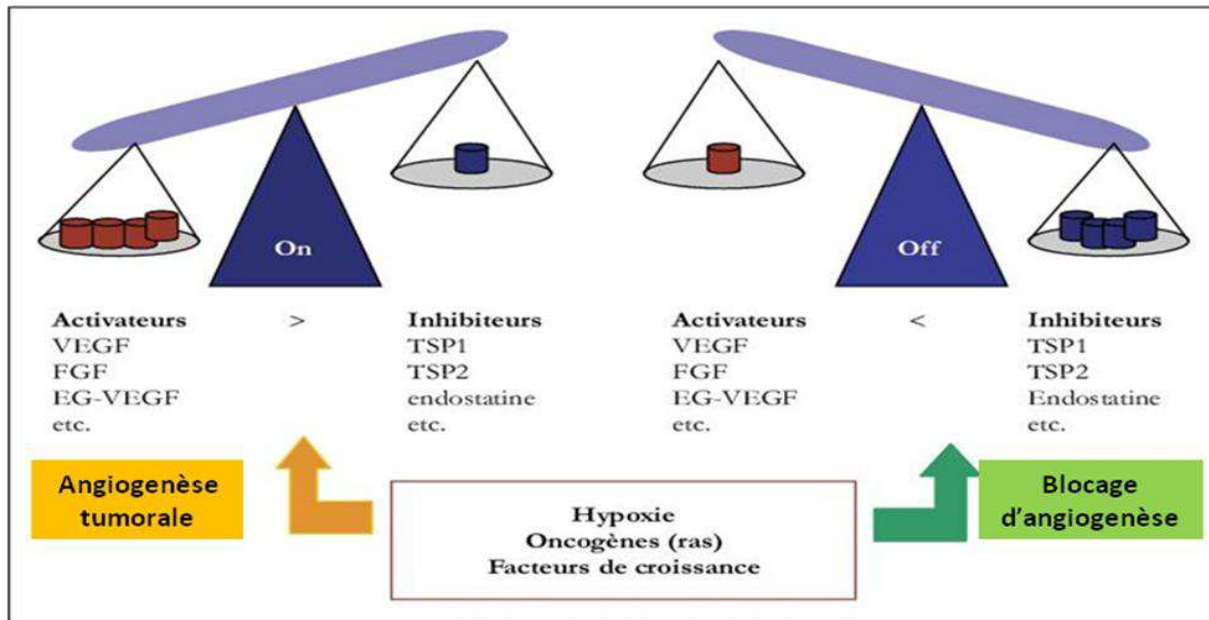
L'angiogenèse est un processus dynamique qui permet la formation de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux préexistants (Figure 15). L'angiogenèse s'applique à des phénomènes physiologiques (croissance embryonnaire, formation du placenta, cicatrisation), à des phénomènes pathologiques (rétinopathie diabétique, dégénérescence maculaire...) et à des phénomènes tumoraux. Dans de nombreux cancers, tels que ceux du sein, de l'estomac et de la vessie, l'angiogenèse accrue est associée à un mauvais pronostic, c'est-à-dire à l'apparition de métastases et à la diminution de la survie du patient (Turner *et al.*, 2003).





**Figure 16 : Schéma représentant le processus d'Angiogenèse** (Méjean et Lebret, 2008).

Folkman (1971) a montré, pour la première fois, que la formation de vaisseaux sanguins est un processus essentiel pour la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Au cours de la première phase de croissance, le tissu cancéreux est avasculaire et soumis à une hypoxie profonde ainsi qu'à une cascade d'événements pro-angiogéniques. L'angiogenèse tumorale est alors régulée par un équilibre entre des molécules pro-angiogéniques (VEGF, PDGF, b-FGF, TGF- $\beta$ ..), qui favorisent ce processus, et des molécules anti-angiogéniques (Angiostatine, thrombospondine...) ; on parle alors de « *switch* angiogénique » (Figure 16). Chacune d'entre elles peut être synthétisée par différents types de cellules : cellules tumorales, cellules endothéliales tumorales, fibroblastes, cellules inflammatoires ou cellules circulantes (EPC ou plaquettes), témoignant de l'incroyable complexité de ce phénomène, parfait exemple de la communication intercellulaire tumeur-hôte (Ferrara et Kerbel, 2005). Cette communication active le phénomène tumoral angiogénique et provoque une évolution rapide de la tumeur et de sa dissémination métastatique. Cette évolution survient suite à une activation longue des cellules endothéliales et à une perturbation de l'équilibre entre facteurs pro- et anti-angiogéniques. Le facteur de croissance VEGF (vascular endothelial growth factor) est considéré comme le plus puissant inducteur de l'angiogenèse.



**Figure 17 : Le switch angiogénique**

Le processus d'angiogenèse est présenté dans les étapes ci-dessous, celles-ci étant régulées par des facteurs angiogéniques (Carmeliet et jain, 2000) (Figure 17):

- 1- Activation des cellules endothéliales et de l'hyperperméabilité des vaisseaux sous l'effet de différents médiateurs tels que des cytokines et VEGF.
- 2- Dégradation de la membrane basale et de la matrice extracellulaire entourant les vaisseaux sous l'effet de protéinases comme MMPs.
- 3- Prolifération des cellules endothéliales activées vers la zone de production des facteurs pro-angiogéniques tel que VEGF.
- 4- Migration des cellules endothéliales vers la source du stimulus angiogénique (chimiotactisme) et réorganisation tridimensionnelle des cellules endothéliales en tubes capillaires sous l'effet du VEGF, des intégrines, d'angiopoïétines 1.
- 5- Stabilisation et formation de la membrane basale, ainsi que d'un nouvel environnement, réalisée sous l'effet de PDGF et du recrutement des péricytes et des cellules lisses.

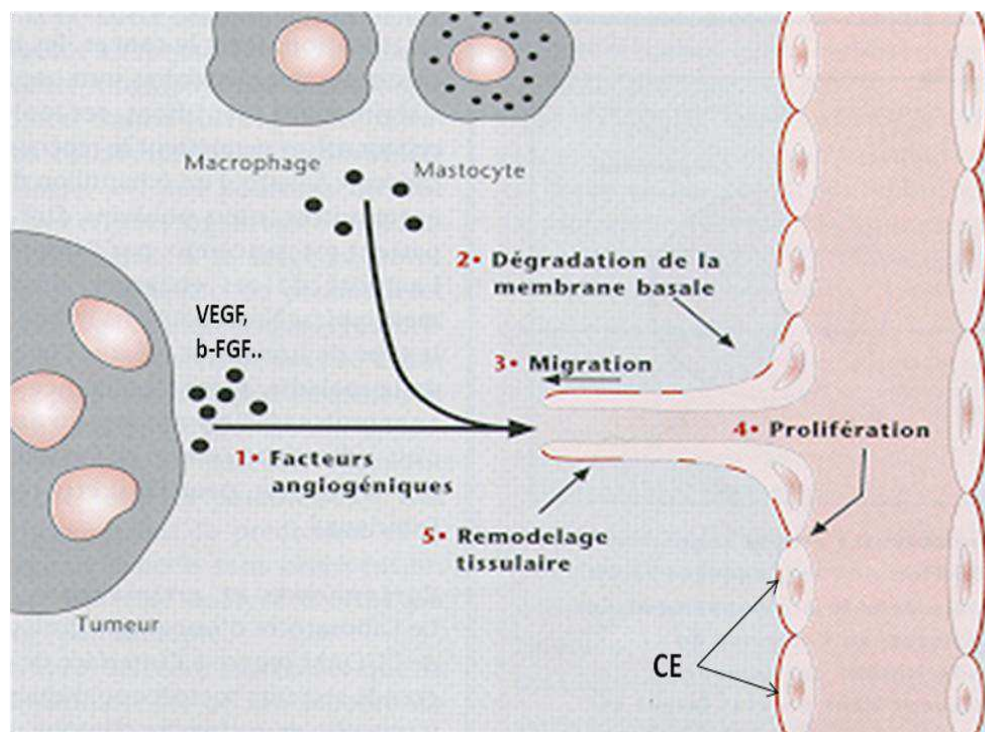
Il est évident, actuellement, que le microenvironnement tumoral joue un rôle primordial dans le phénomène d'angiogenèse, favorisant ainsi la croissance tumorale et la diffusion métastatique. En effet, les molécules angiogéniques peuvent être secrétées par les cellules tumorales elles-mêmes mais aussi par d'autres cellules du microenvironnement tumoral, telles que les cellules endothéliales, les cellules du stroma, du sang et de la matrice extracellulaire (Tableau 2).

Facteurs pro-angiogéniques	Facteurs anti-angiogéniques
<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Facteurs de croissance</b> VEGF, bFGF, EGF, TGF-<math>\alpha</math>, PDGF-<math>\beta</math>, GCSF, TNF-<math>\alpha</math></li> <li><b>Protéases</b> Cathepsine, gélatinase A, B, stromélysine, uPA</li> <li><b>Cytokines</b> IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1</li> <li><b>Autres</b> Hypoxie, hypoglycémie, cyclo-oxygénase-2, SDF-1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><b>Glycoprotéines matricielles</b> Thrombospondine-1 et -2, angiostatine, endostatine</li> <li><b>Cytokines</b> Interféron-<math>\alpha</math> et -<math>\beta</math></li> <li><b>Inhibiteurs de facteurs de croissance</b> PEDF, Vascular endothelial growth inhibitor</li> </ul>

**Tableau 2: Principaux facteurs pro- et anti-angiogéniques.**

*a. Migration et prolifération des cellules endothéliales*

Pendant l'angiogenèse, les cellules endothéliales prolifèrent et migrent pour former des bourgeonnements vers le site de production des facteurs pro-angiogéniques, créant une voie qui va permettre l'alimentation et l'oxygénation de la tumeur (Figure 18). La migration des cellules endothéliales nécessite la dégradation de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire, phénomène assuré par des métalloprotéases. Cette dégradation permet la libération de facteurs de croissance séquestrés dans la matrice extracellulaire, comme VEGF et b-FGF, et une activation de la forme latente de TGF- $\beta$  (Flaumenhaft et Rifkin, 1992 ; Houck *et al.*, 1992).



**Figure 18 : Principales étapes de l'activation des cellules endothéliales lors de l'angiogenèse**

*b. Les métalloprotéases impliquées dans l'angiogenèse tumorale.*

Une partie du processus d'angiogenèse est régulé par l'action de métalloprotéases (MMPs). Celles-ci sont des endopeptidases, secrétées sous forme inactive, qui sont activées en se libérant de leurs pro-peptides sous l'action d'enzymes telles que la plasmine. La formation de nouveaux capillaires peut être empêchée en inhibant les MMPs par les TIMPs (Tissu-inhibiteur métalloprotéases). Des études ont montré que MMP-2 (Fang, 2000 ; Itoh, 1998) et MMP-9 (Vu, 1998) sont tous deux des collagénases de type IV qui jouent un rôle actif dans l'angiogenèse ; leur absence réduit le processus angiogénique et ainsi la progression tumorale. La collagénase MMP-2 induit la libération d'un site de liaison à l'intégrine, suite à son action sur le collagène, ce qui va provoquer la migration des cellules endothéliales (Xu, 2001). Des niveaux très élevés de MMP-9 ont été observés chez des patientes atteintes du cancer du sein (Zucker *et al.*, 1993). La mobilisation et la biodisponibilité de VEGF est dépendante de l'activité de MMP-9. En effet, l'action de celle-ci augmente de manière importante lors de la formation de néo-vaisseaux (Bergers *et al.*, 2000).

A l'inverse, les actions des MMP-2 et MMP-9 possèdent une activité enzymatique qui permet le clivage du plasminogène, ce qui induit la libération d'un fragment ayant un effet anti-angiogénique nommé l'angiostatine (Patterson et Sang, 1997). Cette molécule joue un rôle dans l'inhibition du processus d'angiogenèse et de la migration des cellules endothéliales et (Cornelius *et al.*, 1998).

### *c. Rôle d'IGF-I dans l'angiogenèse des cancers solides*

L'IGF-I joue un rôle au début du phénomène d'angiogenèse. En effet, l'IGF-I induit l'expression de HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-inductible factor 1  $\alpha$ ) (Feldser, 1999). Lorsque la cellule est en hypoxie, HIF-1 $\alpha$  est stable et peut se fixer sur l'élément de réponse à l'hypoxie (HRE) du promoteur du VEGF afin d'entraîner sa transcription (Zelzer *et al.*, 1998). En revanche, en présence d'oxygène, HIF-1 est instable. Une étude sur des cellules issues du cancer du colon, exprimant le récepteur IGF-IR, a montré que l'IGF-I est capable d'induire directement l'expression de HIF-1 en bloquant son ubiquitinylation et sa dégradation *via* les voies PI3-K et MAPK. Il provoque ainsi l'expression de VEGF dans les cellules tumorales (Fukuda *et al.*, 2002).

Les cellules endothéliales des micro-vaisseaux expriment peu le ligand IGF-I, mais elles expriment plus son récepteur IGF-IR. Cependant, l'IGF-IR, activé par IGF-I sécrété par les cellules du microenvironnement tumoral, est très impliqué dans l'angiogenèse car il stimule, d'une part, la prolifération, la différenciation morphologique et la migration des cellules endothéliales et, d'autre part, la survie et la progression de la tumeur (Shigematsu *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 2000). Une étude a montré que l'inhibition du récepteur IGF-IR dans les cellules du cancer gastrique induit une diminution de l'expression de VEGF et une réduction de l'angiogenèse (Li *et al.*, 2011).

### *d. L'angiogenèse dans les maladies hématologiques malignes*

L'angiogenèse accrue est reconnue depuis des années dans les maladies hématologiques malignes, ayant une valeur pronostic, mais le mécanisme moléculaire associé à ce phénomène reste mal connu. Toutefois, il est connu que la niche principale de la leucémie est localisée dans le microenvironnement de la moelle osseuse. Par conséquent, il est évident que la vascularisation de la moelle osseuse joue un rôle dans le développement des hémopathies malignes.

Une étude *in vitro*, réalisée dans notre laboratoire, a montré que les cellules myélomateuses (MM) secrètent VEGF et b-FGF. Leur surnagent induit une formation de réseaux capillaires sur une matrice extracellulaire, le Matrigel® (système d'angiogenèse *in vitro*), à partir des cellules endothéliales de moelle osseuse (HBMEC). Il induit également une augmentation de l'expression des récepteurs de VEGF, VEGFR-1 et VEGFR-3, sur les cellules HBMEC. L'augmentation de l'angiogenèse, provoquée par les cellules MM, est liée à l'activation des voies de PI3-K, ERK et m-TOR ; leur inhibition provoque une diminution de la migration des cellules endothéliales (Mirshahi *et al.*, 2006).

Les cellules stromales de moelle (BMSC), provenant de malades atteints de leucémie aiguë lymphoblastique ou myeloblastique (LA), forment des structures capillaires sur du Matrigel®, à l'inverse des BMSCs normales qui n'en forment pas. Cette formation de réseaux capillaires par les cellules LA est liée à l'action autocrine de l'IGF-I, sécrété de façon accrue par les cellules stromales de moelle leucémique *via* la voie de transduction de PI3-K et Rho GTPase. (Mirshahi *et al.*, 2009).

### 3.4.3. Migration et invasion

Au cours de l'angiogenèse, les capillaires formés par les cellules endothéliales représentent une voie d'approvisionnement en nutriments et oxygène pour la croissance de la tumeur. Ils ouvrent également un accès au système vasculaire, permettant aux cellules cancéreuses de coloniser les autres organes. Cependant, les cellules tumorales et les cellules endothéliales sont fixées sur la matrice extracellulaire grâce à des molécules d'ancrages et à des intégrines. Par ailleurs, elles sont aussi intimement liées entre elles grâce à des molécules d'adhésion cellulaire (CAMs), et principalement grâce à la molécule transmembranaire E-cadhérine. Ainsi, cette dernière joue un rôle essentiel dans l'inhibition du processus de métastases. En effet, la perte de sa fonction adhésive, due à des mutations ou à des altérations des partenaires intra-cytoplasmiques (caténines ou microtubules), est constatée dans de nombreux cancers agressifs (Poupon, 2005). A l'état initial de la tumeur, la membrane basale constitue une barrière pour l'invasion des cellules cancéreuses.

En revanche, grâce à l'action des métalloprotéinases (MMPs) produites par les cellules tumorales elles même et par le stroma, les cellules tumorales vont dégrader la membrane basale. Par cette action, les MMPs, décrites précédemment, participent non seulement à l'angiogenèse, mais favorisent aussi l'invasion métastatique. De plus, certaines MMPs, telles que MMP-3 et MMP-7, peuvent cliver la E-cadhérine, activant ainsi la perte d'adhésion cellulaire et favorisant l'acquisition du phénotype mésenchymateux. Ces modifications vont permettre aux cellules tumorales de migrer et de se métastaser

#### *a. Rôle d'IGF-I*

L'IGF-I est connu pour son rôle dans le contrôle des connexions intercellulaires. Une stimulation de lignée cellulaire de cancer colorectal (C10) par l'IGF-I conduit à une phosphorylation de la  $\beta$ -caténine et d'IRS-1 qui forment un complexe avec la E-cadhérine. La phosphorylation de la  $\beta$ -caténine est associée à sa rupture rapide avec la E-cadhérine, présente dans la membrane cytoplasmique, suivie de sa relocalisation vers le cytoplasme cellulaire (Playford *et al.*, 2000). Ce résultat a été confirmé par une autre étude effectuée sur une lignée de cellules du cancer colorectal (HT29), stimulée par IGF-I, qui montre que, en plus de la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine, la fonction de la E-cadhérine est réduite et la motilité cellulaire accrue (André *et al.*, 1999). Une étude sur une lignée cellulaire du cancer du sein non métastatique (MCF7), stimulée par le ligand IGF-I, a montré une induction de la motilité des cellules par l'intermédiaire de deux voies, PI3-K et MEK1/2 (Guvakova *et al.*, 2002). L'IGF-I peut aussi favoriser la migration et l'invasion des cellules de myélome multiple par l'activation des voies PI3-K/PKC et PI3-K/RhoA (Qiang *et al.*, 2003).

Le système d'IGF-I est également impliqué dans la régulation de l'expression des MMPs. En effet, l'IGF-IR a été identifié comme un inducteur de l'expression transcriptionnelle et protéique de MMP-2 et de l'invasion tumorale au travers du Matrigel® (Samani *et al.*, 2007). Brodt *et al.*, (2001) a montré que l'expression de MMP-2 est également dépendante des deux tyrosines 1250/1251 présentes à l'extrémité C-terminal du récepteur IGF-IR, et que la présence de ces deux régions est importante pour induire l'invasion tumorale et la formation de métastase. Cependant, IGF-1 est capable d'exercer une double régulation sur l'expression de MMP-2. En

effet, il peut augmenter sa synthèse en empruntant les voies de signalisation de PI3-K, AKT et m-TOR ou réguler négativement son expression *via* la voie de MAPK (Zhang *et al.*, 2004).

Par ailleurs, IGF-I induit une amélioration de la migration des cellules du cancer du sein (MCF7), médiée par une augmentation de l'activité protéolytique de MMP-9 (Mira *et al.*, 1999), et promeut par conséquent l'invasion tumorale. De plus, les MMPs peuvent augmenter la biodisponibilité de l'IGF-I dans le microenvironnement tumoral en dégradant les IGFBP-3 (Fowlkes *et al.*, 1994) et IGFBP-5 (Thraillkill *et al.*, 1995), ce qui montre une relation réciproque entre les systèmes. Une étude sur une lignée cellulaire issue du cancer de la prostate (DU-145), transfectées avec un ADN antisens inhibant l'activité de MMP-9, montre une diminution de la prolifération cellulaire associée à une réduction de la protéolyse d'IGFBP-3 et ainsi une diminution de l'activité d'IGF-IR, mais ce résultat est inversé en rajoutant IGF-I de manière dose dépendante (Mañes *et al.*, 1999).

Enfin, IGF-I régule également le système constitué d'uPA (urokinase-type plasminogen activators) et de son récepteur uPAR, qui joue un rôle dans la dégradation de la matrice extracellulaire. Ce système influence l'invasion de certains types de cancers tels que le cancer du pancréas (Bauer *et al.*, 2005).

### 3.5.L'IGF-IR, cible thérapeutique

Le récepteur IGF-IR est une molécule qui joue un rôle essentiel dans les différentes étapes de développement du cancer. De plus, son ligand IGF-I est surexprimé dans de nombreux cancers tels que le cancer du sein, des poumons, de l'ovaire etc. L'inhibition de l'IGF-IR apparait donc comme une cible très prometteuse pour rendre les cellules cancéreuses sensibles à la chimiothérapie, réduire leur croissance et diminuer leur survie. Ainsi, différentes molécules inhibitrices du récepteur IGF-IR ont été déjà développées dans ce but, telles que les anticorps monoclonaux ou de petites molécules inhibitrices de la tyrosine kinase du récepteur. De nombreuses études précliniques ont montré que l'inhibition de l'IGF-IR réduit la croissance des cellules dans certains cancers comme le cancer du sein, le cancer de la prostate et le myélome.



Il est à noter que dans la majorité des essais cliniques de phase I, l'utilisation des drogues ciblant l'IGF-IR entraîne des dérégulations endocrines qui touche l'homéostasie physiologique contrôlée par l'IGF-I et une hyperglycémie.

D'autres conséquences majeures peuvent être entraînées par l'inhibition de IGF-1R dans les cancers. En effet, l'action de IGF-1 dans le développement, l'inhibition de son récepteur peut mener des retards de croissance chez les sujets jeunes pouvant avoir recours à ces traitements ciblés de longue durée (Sachdev et Yee, 2007). Un inhibiteur de IGF-IR pour être efficace, doit inhiber la liaison de l'IGF-1 à son récepteur, doit inhiber l'autophosphorylation du récepteur et induire une diminution de son expression et ne doit pas avoir d'effet, ou peu d'effets, sur le récepteur d'insuline.

### III. Chimiorésistance

#### 1. Généralité

L'efficacité de la chimiothérapie anticancéreuse se trouve limitée par le phénomène de la résistance aux médicaments. En effet, la tumeur peut résister à la chimiothérapie de manière intrinsèque ou acquérir une résistance pendant le traitement alors qu'elle y était sensible. La résistance à la chimiothérapie serait ainsi à l'origine de l'échec du traitement chez plus de 90% des patients atteints d'un cancer métastatique (Longley et Johnston, 2005). Il est évident que, si la chimiorésistance pouvait être surmontée, l'impact sur la survie des patients serait très important.

La chimiorésistance, qui provoque une inefficacité initiale ou progressive des traitements de la chimiothérapie, se traduit à plusieurs niveaux :

- Augmentation d'afflux ou diminution d'influx des substances actives
- Diminution de leur pénétration à travers la membrane plasmique
- Modification des cibles moléculaires thérapeutiques Augmentation de l'inactivation du médicament
- Abolition d'apoptose

Il existe de nombreux mécanismes responsables de la chimiorésistance, mais le mécanisme le plus répondu est attribué à une famille de transporteurs membranaires nommé ATP-binding cassette (protéines ABC) tels que P-gp, MRP, BCRP etc. (Yakirevich *et al.*, 2006). La famille ABC est souvent responsable de la résistance de la tumeur à travers l'expulsion accrue, hors de la cellule, des molécules utilisées dans les traitements de la chimiothérapie. Ce mécanisme peut affecter une large gamme de médicaments par différentes actions, ce qu'on le nomme multidrug resistance (MDR). La toxicité des médicaments sur les cellules, souvent associée au phénomène MDR, concerne les substances comme les taxanes, les anthracyclines, les alcaloïdes de la pervenche. La modification des molécules cibles est un obstacle pour la thérapie anticancéreuse. En effet, la résistance à la doxorubicine, par exemple, est observée suite à une mutation de la topoisomérase. De la même manière, le remaniement de la dynamique des microtubules conduit à une résistance aux taxanes ainsi qu'aux alcaloïdes de pervenche.

## 2. La famille des protéines ABC

Les protéines ABC constituent une grande famille de protéines, formée de 7 sous-familles, qui nécessitent un apport d'énergie fournie par l'hydrolyse d'ATP. Elles sont présentes dans toutes les cellules vivantes depuis les plantes, eucaryotes supérieurs, jusqu'aux bactéries (Dassa *et al.* 2001). Les protéines ABC ATP-dépendantes permettent le transport actif d'une très large gamme de substrats à travers la membrane plasmique, assurant ainsi les échanges entre les cellules et leur environnement.

Le phénomène MDR est le plus souvent lié à la surexpression d'une glycoprotéine membranaire, nommée P-gp. La surexpression de cette protéine est observée dans de nombreuses cellules cancéreuses résistantes à la chimiothérapie, celles-ci étant présentes dans les cancers solides, principalement le cancer de l'ovaire (Thomas et Coley, 2003 ; Krishna et Mayer, 2000). Une étude de Hille *et al.*, (2006), réalisée sur des cellules tumorales issues de 77 patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire et présentant une récurrence, a montré, d'une part, une surexpression de la P-gp et, d'autre part, que cette protéine était souvent associée à un mauvais pronostic. La même étude a montré que des échantillons de prélèvements d'ascites, cultivées en présence du taxane, un médicament anticancéreux, surexpriment la protéine P-gp et que certaines patientes présentent, de surcroît, une résistance croisée aux sels de platine.

En sus de la P-gp, il existe d'autres pompes de transport membranaire impliquées dans le phénomène de multidrug- résistance des cellules cancéreuses, telles que les MRPs et la BCRP. Dans ce mémoire de thèse, nous avons choisi d'étudier les protéines ABC présentées dans la littérature comme étant les éléments majeurs impliqués dans le phénotype multi chimio-résistant des cancers. Les principales protéines étudiées sont décrites dans le tableau 3 ci-dessous :

Nom	Chromosome	Protéines - nb d'AA (kDa)	Site d'expression	Principale de chimiorésistance
<b>P-gp (ABCB1)</b>	7q21	1280 (170)	Cerveau, rein	Alcaloïdes de la pervenche, anthracyclines, taxanes
<b>MRP1 (ABCC1)</b>	16p13.12-13	1531 (190)	Poumon, testicules	Alcaloïdes de la pervenche, anthracyclines, methotrexate
<b>MRP2 (ABCC2)</b>	10q23-24	1545 (190 - 200)	Foie	Alcaloïdes de la pervenche, anthracyclines, methotrexate, platin-drugs
<b>MRP3 (ABCC3)</b>	17q21.3	1527 (190)	Poumon, intestin, foie	Alcaloïdes de la pervenche, methotrexate, epipodophyllotoxines
<b>MRP5 (ABCC5)</b>	3q27	1437 (190 - 200)	Ubiquitaire	Analogues de nucléotides, 6-mercaptopurine
<b>BCRP (ABCG2)</b>	4q22	655 (70)	Intestin, placenta	Anthracyclines, methotrexate, topotecan

**Tableau 3 : Les caractéristiques des principales protéines ABC**

### 3. La chimiorésistance par les cellules stromales mésenchymateuses

Le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans la progression des cancers et la dissémination métastatique. Il peut également constituer une barrière physique qui rend les cellules cancéreuses moins accessibles ou résistantes à la chimiothérapie. Ainsi, les cellules stromales mésenchymateuses (CSMs), anciennement appelées cellules souches mésenchymateuses, sont des cellules souches adultes dérivées de la moelle osseuse. Ces cellules

sont recrutées en grand nombre de la moelle vers les sites des tumeurs où elles contribuent à l'invasion, la métastase et la chimiorésistance des cellules tumorales (Lis *et al.*, 2012). En effet, les CSMs peuvent transmettre aux cellules tumorales du cancer de l'ovaire des capacités de résistance à la chimiothérapie (Rafii *et al.*, 2006). Les CSMs participent également à la progression de certains cancers en produisant la protéine BMP-2 (Bone Morphogenetic Protein), ce qui induit une prolifération accrue des cellules tumorales (McLean *et al.*, 2011).

Les interactions entre les cellules cancéreuses, telles que les cellules issues du cancer de la prostate et les cellules stromales mésenchymateuses, provoquent des modifications sur l'expression de certains gènes, par exemple la surexpression du gène *uPA* qui joue un rôle dans le processus d'invasion des tumeurs (Zhang *et al.*, 2009).

De plus, l'adhérence au stroma médullaire des lignées cellulaires hématopoïétiques malignes, comme le myélome, la leucémie myéloïdes aiguë et chronique et la leucémie lymphoïde chronique, confère une résistance à une large gamme de médicaments cytotoxiques et limite le mécanisme d'apoptose (Burger *et al.*, 2009 ; Shain *et al.*, 2002 ; Vogler *et al.*, 2009). D'un point de vue thérapeutique, les CSMs ont récemment été l'objet d'un vif intérêt, et une compréhension approfondie de leurs caractéristiques moléculaires pourrait permettre d'orienter les recherches vers de nouvelles approches thérapeutiques spécifiques.

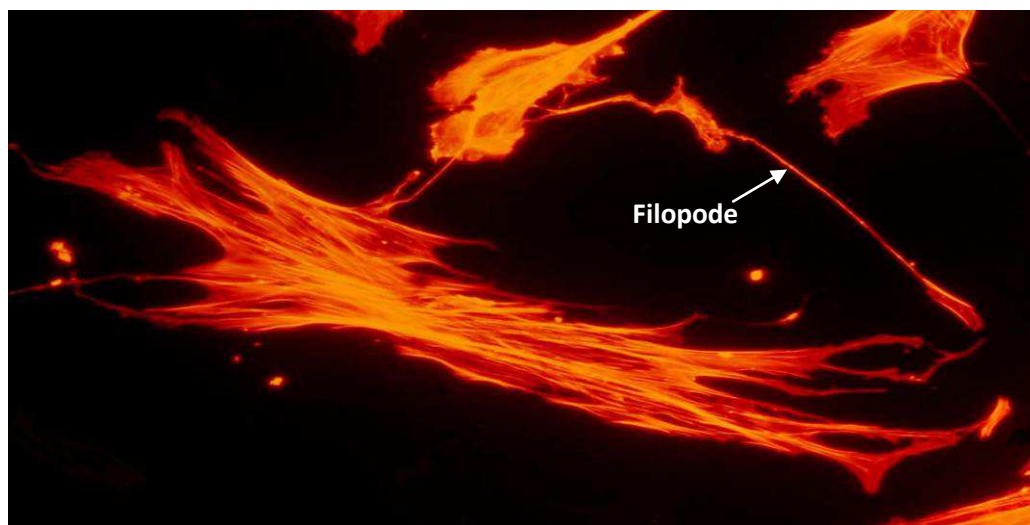
#### **4. Rôle des Hospicells dans la protection des cellules cancéreuses**

Notre laboratoire a identifié de nouvelles cellules stromales lors d'une longue culture des cellules souches médullaire (CSM) dans un milieu sélectif. Ces cellules hôtes de grande taille, à morphologie très proche des fibroblastes, nommées « Hospicells », présentent des pseudopodes et des filopodes (Figure 19). Leur physiologie leur donne la capacité de s'adhérer aux cellules tumorales.

Nos études ont alors porté sur l'identification des caractéristiques moléculaires des hospicells. Les résultats montrent que ces cellules expriment les CD9, CD10, CD29, CD146 et CD166. En revanche, elles n'expriment pas le marqueur CD45, ce qui suggère que ces cellules ne sont pas des cellules hématopoïétiques.

Une étude de notre groupe a montré que les hospicells, grâce à leurs propriétés de fixer les cellules cancéreuses, protègent celles-ci contre la chimiothérapie (Rafi *et al.*, 2008). En effet, les hospicells expriment de nombreuses pompes ABC responsables de la chimiorésistance des cellules tumorales. Lors d'une co-culture de ces cellules avec les cellules du cancer de l'ovaire, en plus de l'adhérence spécifique formée entre ces deux populations de cellules, un échange membranaire est observé sous la forme d'un phénomène de « trogocytose », permettant aux cellules cancéreuses d'acquérir les protéines membranaires ABC des cellules stromales et de devenir résistantes. En effet, la trogocytose est un mécanisme qui permet à deux cellules d'échanger une partie de leur membrane plasmique et, par conséquent, les protéines présentes sur la partie concernée. Si ces protéines, issues de la cellule donneuse, ne sont pas présentes initialement dans la membrane de la cellule receveuse, cette dernière peut acquérir de nouvelles fonctionnalités.

Les hospicells sont présentes dans le stroma de nombreux cancers et dans les liquides d'ascites des malades atteints de cancer. Il est donc nécessaire d'étudier leur influence réelle sur le développement des cellules tumorales et ainsi leur implication dans la chimiorésistance dans le microenvironnement tumoral contenant des facteurs de croissance.



**Figure 19 : Morphologie des hospicells (Rafii *et al.*, 2008).**

## IV. Objectifs de travail

L'ensemble des données de la littérature, présenté dans ce mémoire, démontrait l'importance des interactions entre les cellules tumorales et leur microenvironnement pour le développement, la progression et la chimiorésistance des cellules cancéreuses. Ainsi, nos recherches visaient à confirmer (lignée cellulaire du cancer de l'ovaire) ou identifier (lignées cellulaires leucémiques myéloïdes) l'implication des cellules stromales, et plus particulièrement les hospicells du microenvironnement, qui jouent probablement un rôle important dans la chimiorésistance et la survie des cellules cancéreuses. Nous avons également étudié le rôle de l'IGF-I dans les mécanismes de croissance et de survie des cellules cancéreuses. En nous appuyant sur ces données, nous avons émis l'hypothèse suivante : l'IGF-I, produit par le microenvironnement tumoral, peut être sécrété par les hospicells. Grâce à la liaison de ces dernières avec les cellules cancéreuses, l'IGF-I va agir par effet paracrine, *via* son récepteur IGF-IR présent dans la membrane des cellules tumorales, sur la régulation de l'expression des pompes ABC de ces cellules.

Notre objectif de travail était donc de démontrer, dans un premier temps, l'implication de l'IGF-I (exogène et sécrété par les hospicells) dans la régulation des gènes ABC codant les protéines ABC dans une lignée cellulaire issue du cancer de l'ovaire (OVCAR3) ainsi que dans les lignées cellulaires des Leucémies Myéloïdes sensibles HL60 et K562 et leurs cellules dérivées résistantes HL60/DNR et K562/Dox. Dans un deuxième temps, nous avons cherché, d'une part, à étudier si l'IGF-I peut être sécrété par les hospicells et, d'autre part, à élucider l'implication éventuelle de ce ligand dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses étudiées, co-cultivées avec les cellules hospicells, vis-à-vis des médicaments utilisés. Enfin, nous avons étudié l'effet *in vivo* des hospicells sur la croissance des cellules cancéreuses de l'ovaire et sur le phénomène d'angiogenèse.

Dans une étude en parallèle, nous avons étudié l'implication de la métalloprotéinase MMP-9 dans deux processus impliqués dans la formation des métastases, dans des cellules cancéreuses résistantes du sein exprimant la protéine P-gp: la migration, et la formation du réseau tubulaire et déterminé un éventuel lien entre son expression et l'expression de P-gp.

## V. Matériels et Méthodes

### 1. Culture cellulaire

#### 1.1. Lignées cellulaires

La lignée cellulaire d'adénocarcinome d'ovaire humain (OVACR3) a été obtenue à partir de l'American Type Culture Collection (ATCC). Les cellules OVACR, génétiquement modifiées par vecteur lentiviral codant eGFP (Genethon, Evry), ont aussi été utilisées dans cette étude, (OVCAR-eGFP). Quatre lignées cellulaires issues de leucémie myéloïde K562 et HL60 et leurs dérivés K562/Dox et HL60/DNR nous ont été offertes par R. Tang, Hôpital Hôtel Dieu à Paris, et ont été développées comme des lignées résistantes à la Doxorubicin et à la Daunorubicin respectivement. Toutes ces cellules ont été cultivées dans un milieu RPMI-1640 complet contenant 10% de sérum bovin fœtal (FBS), 1% de L-glutamine et 1% d'antibiotique (pénicilline et streptomycine) et incubées à 37°C dans une atmosphère humidifiée avec 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 1.2. Hospicells

##### *1.2.1. Hospicells isolées à partir des ascites*

Les Hospicells ont été isolées à partir des ascites des patientes atteintes du cancer de l'ovaire au stade III. Ces cellules ont été obtenues selon le protocole décrit dans l'article de Pasquet *et al.*, (2010) présenté dans la partie résultats. Ensuite, les hospicells ont été immortalisées avec l'antigène du virus SV40 (laboratoire de Toulouse) et ont été nommées cellules M16.

##### *1.2.2. Hospicells isolées à partir de la moelle osseuse*

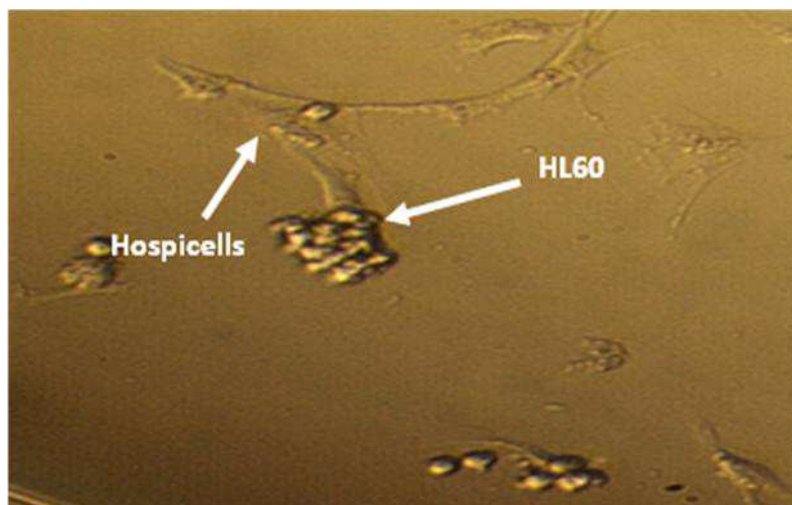
Les hospicells ont été isolées à partir de trois moelles osseuses de donneurs (Hôpital Hôtel Dieu, Paris). L'étape d'isolation des cellules mononuclées de la moelle a été effectuée par centrifugation sur un gradient de Ficoll. Les monocytes présents dans l'échantillon ont été écartés par leur adhérence sur le plastique des boîtes de pétri pendant 30 min. Ensuite, les cellules non adhérentes ont été collectées et utilisées pour isoler les cellules CD34<sup>+</sup> ou CD133<sup>+</sup>. Les cellules CD34<sup>+</sup> ou CD133<sup>+</sup> ont été isolées par tri sur billes magnétiques. En effet, les cellules CD34<sup>+</sup> se



fixent sur les billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD34+ (avec immunomagnetic beads ; MACS ; Miltenyi Biotec, Paris). Les cellules ont été libérées avec un tampon acide et neutralisées. Ensuite, les cellules CD34+ ou CD133+ ont été mises en culture pendant 3 semaines dans des puits recouvert de gélatine à 0.2% dans un milieu de culture sélectif MV2. Après 3 jours de culture à 37°C dans une atmosphère humide et 5% de CO<sub>2</sub>, les cellules non adhérentes ont été éliminées. Les cellules adhérentes ont été détachées avec l'accutase, comptées et ensuite mises en culture dans une plaque de 24 puits à raison de 10<sup>5</sup> cellules/ml de milieu de MV2.

Après leur mise en culture, les cellules CD34+ ou CD133+ se sont différenciées en cellules endothéliales, en cellules musculaires, en cellules fibroblastiques et en hospicells nouvellement identifiées par notre laboratoire. Celui-ci a montré que les cellules HL60 fixent les hospicells en formant des rosettes (Figure19). Cette caractéristique a d'ailleurs été mise à profit pour leur séparation des autres cellules adhérentes. En effet, les rosettes sont formées après 2 h d'incubation des hospicells–cellules HL60 à 37°C, et les cellules non adhérentes sont éliminées. Après des lavages avec le milieu RPMI sans sérum, les cellules ont été incubées dans 1 ml de milieu MV2 pendant 18h à 37°C. Après l'élimination du surnageant, les cellules ont été détachées avec l'accutase et les agrégats « hospicells-HL60 » ont été séparés des autres cellules par centrifugation à 1000 tours/min pendant 5 min en les récupérant dans le culot. Les agrégats ont ensuite été remis en culture dans un milieu MV2 complété avec 10 % de SVF.

Une élimination des cellules HL60 s'imposait pour la continuité des expériences. Le milieu de culture a été jeté, 1 ml d'EDTA à 1% a été ajouté dans chaque puits après le lavage des cellules. Après une agitation vigoureuse pendant 10 min, les cellules HL60 se sont détaché des hospicells et se sont trouvées dans le surnageant qui a été jeté. Les hospicells ont ensuite été cultivées dans le milieu MV2 complet.



**Figure 20 : Fixation des cellules HL60 sur les hospicells et formation des rosettes après 18h d'incubation.**

### 1.3. Préparation du surnageant des hospicells (cellules M16)

Les cellules M16 ( $10^6$  cellules/ml de milieu de culture) ont été incubées pendant 24h à 37°C dans un milieu RPMI sans SVF. Après la période d'incubation, le surnageant a été collecté et conservé à -80°C. Le surnageant des hospicells a été utilisé pour étudier son effet sur la résistance des cellules OVCAR3 contre les médicaments de la chimiothérapie en présence de l'IGF-I ou de l'inhibiteur du récepteur IGF-IR cyclolignan picropodophyllin (PPP).

### 1.4. Traitement des cellules avec IGF-I et inhibiteurs

Les cellules adhérentes OVCAR3 ont été cultivées seules ou avec les hospicells isolées d'ascites pendant 24h dans un milieu de culture sans SVF contenant ou non IGF-I (200 ng/ml). Les cellules ont été également incubées avec un des inhibiteurs suivants (Calbiochem) : 1 $\mu$ M de picropodophyllin (PPP), inhibiteur de IGF-IR ; 5 $\mu$ M de wortmannin, inhibiteur de PI3 kinase ; 5 $\mu$ M de Rottlerin, inhibiteur de PKC ; 5 $\mu$ M de PD98059, inhibiteur de MEK et 5 $\mu$ M d'inhibiteur de STAT3. Les cellules leucémiques K562, K562/DOX, HL60 et HL60/DNR, qui sont des cellules en suspension, ont été co-cultivées avec les hospicells isolées à partir de la moelle osseuse pendant 24h à 37°C dans les mêmes conditions que celles des cellules OVCAR.

## **2. Transcription inverse et polymerase chain reaction (RT-PCR)**

### **2.1. Extraction des ARN messagers (ARNm) et transcription inverse**

Les ARN totaux ont été extraits en utilisant le kit Nucleospin RNA-II kit (Macherey-Nagel EURL, Hoerdlt, France). Les cellulesensemencées à raison de  $5 \times 10^6$  /ml ont été rincées avec un tampon phosphate salin (PBS) froid et ensuite lysées à l'aide d'un tampon de lyse à 0°C pour éviter la dégradation des ARNs. L'ARN et l'ADN ont été collectés sur une membrane en silicone. Ensuite, la DNAase a été appliquée directement sur la membrane pour dégrader l'ADN. Enfin, après plusieurs lavages, l'ARN total pur a été élué avec de l'eau pure dépourvue d'ARNase.

Après un contrôle qualité dans un gel 2% agarose et quantification au spectromètre, 1µg d'ARNm des ARN totaux extraits a été rétrotranscrit en ADN complémentaires (ADNc) à l'aide de M-MLV transcriptase inverse. Les ARN ont été dénaturés pendant 5 min à 65°C et incubés 30 min à 42°C dans un volume final de 20µl qui contenait un tampon approprié (5 M Tris-HCl, pH 8.8; 2 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , and 1 M  $\text{MgCl}_2$ ), 1.25 mM dNTP (Sigma-Aldrich), 10 pmol d'amorce oligo (dT) (promega) et 200 U de MM-MLV transcriptase inverse (Invitrogen-Gibco, Paisley, UK). Le mélange a été chauffé à 72°C pendant 3 min à la fin de la réaction pour inactiver la reverse transcriptase.

### **2.2.Polymerase chain reaction (PCR)**

La réaction de PCR a été réalisée sur l'ADNc obtenu en utilisant des amorces synthétiques (Eurobio, Paris, France). La PCR a été effectuée dans un volume total de 25µl composé de 5µl de l'ADNc, 0,25 µM de chaque amorce, 2.5 unités de Taq DNA polymérase (Gibco), 200 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 Mm  $\text{MgCl}_2$ . Ensuite, le mélange a été amplifié dans un thermocycleur (GeneAmp 9600, Perkin Elmer, Wellesley, USA). Chaque amplification était composée d'une étape de dénaturation de 2 min à 94°C, suivie d'une étape d'hybridation à une température d'hybridation spécifique pour amorces des gènes recherchés (Tableau 4) pendant 1 min, et enfin d'une étape d'élongation à 72°C pendant 1 min pour un total de 35 cycles. Des contrôles négatifs sans l'ADNc ont également été réalisés. Les produits d'amplification (15µl) ainsi qu'un marqueur de taille (DNA ladder 100 pb, Invitrogen) ont ensuite été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose de 1.2% (Gibco) dans un tampon 0.45 Mm Tris-borate

contenant 0.2% de bromure d'éthidium et 1 mM EDTA. Les gels ont ensuite été visualisés à la lumière des U.V. (Vilber Lourmat). Les produits de PCR ont été normalisés par rapport à la  $\beta$ 2-microglobuline.

Messenger	Amorces	Température d'hybridation des amorces (C°)	Taille de l'amplifiat (pb)
<b><i>IGF-I</i></b>	5'-AAATCAGCAGTCTTCCAAC-3' 5'-CTTCTGGGTCTTGGGCATGT-3'	60	410
<b><i>IGF-II</i></b>	5'-AGTCGATGCTG GCTTCTCA-3' 5'-GTGGGCGGGGTCTTGGGTGGGTAG-3'	60	472
<b><i>IGF-IR</i></b>	5'-GACATCCGCAACGACTATCAG-3' 5'-GTAGTTATTGGACACCGCATC-3'	52	314
<b><i>IGF-IIR</i></b>	5'-TACAACTTCCGGTGGTACACCA-3' 5'-CATGGCATAACCAGTTTCCTCCA-3'	52	144
<b><i>MDR1</i></b>	5'-GTTATAGGAAGTTTGAGTTT-3' 5'-AAAACTATCCCATAATAAC-3'	58	201
<b><i>MRP1</i></b>	5'-AATGCGCCAAGACTAGGAAG -3' 5'-ACGGGAGGATGTTGAACA AG-3'	60	990
<b><i>MRP2</i></b>	5'- CTGGTTGATGAAGGCTCTGA-3' 5'-CTGCCATAATGTCCAGGTTC-3'	60	1067
<b><i>MRP3</i></b>	5'-GCAGGTGACATTTGCTCTGA-3' 5'- CCC TCTGAGCACTGGAAGTC-3'	62	564
<b><i>MRP5</i></b>	5'-GGATAACTTCTCAGTGGG- 3' 5'-GGAATGGCAATGCTCTAAAG-3'	56	381
<b><i>BCRP</i></b>	5'-TTAGGATTGAAGCCAAAGG-3' 5'-TAGGCAATTGTGAGGAAAATA-3'	52	446
<b><i><math>\beta</math>2-microglobuline</i></b>	5'-CCAGCAGAGAATGGAAAAGTC-3' 5'-GATGCTGCTTACATGTCTCG-3'	60	114

**Tableau 4 : Séquences des amorces utilisées pour la PCR**

### **3. Immunocytochimie**

#### **3.1. Expression des protéines IGF par les cellules OVACR3 et les cellules leucémiques**

Les cellules OVACR3 ont étéensemencées à raison de 20.000 cellules/puits dans des chambres de culture sur lame de verre (lab tek, Nunc, Naperville, IL, USA). Les cellules ont ensuite été fixées pendant 10 min dans un mélange éthanol - acide acétique froid qui permet aussi la perméabilité de la membrane cellulaire. Elles ont alors été rincées, réhydratées avec du PBS 1 et incubées pendant 30 min à température ambiante avec du PBS additionné d'albumine sérique de bœuf 5% (BSA) pour saturer les sites aspécifiques. Après des lavages dans du PBS contenant du BSA 0,1%, les cellules ont été incubées 3h à température ambiante avec un des anticorps primaires (50 µg/ml) anti-IGF-I, anti-IGF-II, anti-IGF-IR ou anti-IGF-IIR (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Après des lavages au PBS 1X - BSA 0,1%, elles ont à nouveau été incubées 1h30 à température ambiante avec l'anticorps secondaire : soit anti-IgG de souris pour les anti-IGFs, soit anti-IgG de chèvre pour les anti-IGFRs (dilution 1/200). Enfin, une incubation des cellules a été réalisée pendant 45min avec la streptavidine couplée à la fluorescéine isothiocyanate (FITC) dilué 1/500. Les résultats ont ensuite été visualisés au microscope à fluorescence.

#### **3.2. Etude de l'expression de la protéine P-gp**

La régulation d'expression de la protéine P-gp a été étudiée dans les cellules leucémiques K562, K562/Dox, HL60 et HL60/DNR incubées en présence ou en absence de l'IGF-I. Après 24h d'incubation, l'expression de la protéine P-gp a été étudiée, en utilisant un anticorps monoclonal UIC2 (Immunotech, France), puis marquée avec un anticorps secondaire conjugué à la phycoerythrin. Les cellules ( $1 \times 10^6$ /ml de milieu de culture) ont été fixées et perméabilisées avec IntraPrep<sup>TM</sup> (Beckman Coulter, Villepinte, France). La fluorescence a été mesurée et analysée par cytométrie en flux (ratio de mean fluorescence intensity/ MFI et isotype control). Les expériences ont été réalisées en triplicata.

## **4. Etudes de la chimiorésistance des cellules tumorales**

### **4.1. Effet des hospicells isolées d'ascites sur la chimiorésistance des cellules**

#### **OVCAR3**

Les hospicells ont étéensemencées en premier à 60% de confluence dans une plaque de 96 puits dans un milieu complet avec 10% de SVF. Après 18h d'incubation, les cellules adhérentes OVCAR3-eGFP (10 000 cellules/puits) ont été ajoutées et co-cultivées avec les hospicells en présence de IGF-I, 100µg ; de PPP, 1µM ou siRNA inhibiteur de IGF-IR, 10nM (Eurobio, France) pendant 24h avant addition de 22.2 µM de carboplatin et 1.4µM de taxol. La même expérience a été effectuée sur les cellules OVCAR incubées dans les surnageants des cellules hospicells décrits précédemment. Les effets des agents cytotoxiques ont été évalués quantitativement à l'aide d'un lecteur à fluorescence de GFP (wallac, PerkinElmer, Waltham, MS, USA) à 488 nm d'excitation et 510 d'émission. Chaque condition a été répétée en trois puits.

### **4.2. Effet des hospicells de la moelle osseuse sur la chimiorésistance des cellules**

#### **leucémiques HL60 et HL60/DNR**

Les cellules HL60 et HL60/DNR sont des cellules cultivées en suspension et qui adhèrent aux hospicells en formant des rosettes (Figure 19). Après 18h de culture des hospicells dans une plaque de 96 puits à 37°C, les cellules HL60 ou HL60/DNR ont été rajoutées à leur tour (10 000 cellules de chaque lignée/puits) et co-cultivées avec les hospicells dans les mêmes conditions que l'expérience précédente. Les cellules HL60 et HL60/DNR ont ensuite été séparées des hospicells de moelle avec 1ml d'EDTA à 1% ajouté dans chaque puits et une agitation vigoureuse. La densité optique de chaque puits a été mesurée par un spectromètre (wallac, Perkin Elmer, Waltham, MS, USA) en utilisant la technique de MTT. La densité optique des cellules contrôles incubées dans un milieu de culture sans SVF et en absence de : IGF, PPP et médicaments anticancéreux a été également mesurée. Ces expériences ont été réalisées en triplicata.

## **5. Analyse de l'expression des gènes ABC par les hospicells en Gene Array**

Les expressions des gènes de la famille IGF (IGF-I, IGF-II, IGF-IR et IGF-IIR) ont été analysées dans les cellules M16 sur microarray (PIQOR Microarray; Miltenyi Biotec. GmbH, Bergish Galdbach, Germany).  $5 \times 10^6$  cellules M16 ont été lysées avec le réactif Trizol® (Invitrogen, Carlsbad, CA) et envoyées à Miltenyi Biotec GmbH dans de la carboglace. L'expérience de gène array a été réalisée selon le protocole de Ducros *et al.*, 2007. L'expression de différents gènes codant des facteurs de croissances et cytokines ont été également étudiée dans les cellules OVCAR3 incubées dans le surnageant des hospicells précédemment préparé.

## **6. Analyse de niveau de sécrétion des protéines de la famille IGF par les cellules M16, par la méthode de protéine Array**

Nous avons analysé le surnageant des cellules M16 pour mesurer la quantité des protéines de la famille IGF (IGF-I, IGF-II, IGF-IR soluble) en utilisant la technique de protéine array (Human Cytokine Antibody Array; Ray Biotech, Norcross, GA). Cette technique est basée sur le principe d'ELISA. Des membranes sur lesquelles 174 anti-cytokines étaient fixées avec des contrôles appropriés ont été utilisées. Le surnageant des cellules M16 précédemment préparé contenait des protéines qui ont été couplées avec leurs anticorps spécifiques fixés sur la membrane. La membrane a été saturée pendant 2h avec du BSA à température ambiante pour bloquer les sites aspécifiques. Ensuite, le surnageant des cellules M16 a été incubé toute la nuit à 4°C avec les anticorps spécifiques des membranes array. Après plusieurs lavages, les membranes ont été incubées en présence d'un mélange d'anticorps anti-cytokines biotinylés toute la nuit à 4°C. La streptavidine couplée avec HRP a été ajoutée sur les membranes, le tout étant incubé pendant 2h à température ambiante.

La présence d'une protéine couplée à son anticorps a été révélée en appliquant sur la membrane le réactif ECL (Enhanced ChemiLuminescence, Perkin Elmer). La membrane a été séchée puis exposée sur un film photographique (Amersham Biosciences) avant d'être développé (Kodak X-OMAT 1000 Processor). Les résultats exprimés ont été présentés comme la valeur de l'intensité de chimioluminescence des spots d'expériences comparés au contrôle.

## **7. Analyses statistiques**

Les résultats ont été présentés comme moyenne  $\pm$  SE et les données ont été analysées à l'aide de test T.student. La valeur  $P < 0.05$  est considérée comme significative.



## **VI. Résultats**

**Article1.** Cet article est soumis dans International Journal of Oncology

**Ovarian ascites-derived hospicells promote up regulation of the ATP-binding cassette genes by Insulin-like Growth Factor-I via JAK-STAT3, MEK signaling pathway in ovarian cancer cell line**

Benabbou N., Mirshahi P., Azzazene D., Cadillon M., Soria J., Therwat A., Mirshahi M.

Dans ce travail, nous avons étudié le rôle de IGF-I sécrété par le microenvironnement sur la chimiorésistance induite par l'interaction de cellules du cancer de l'ovaire et les hospicells isolées à partir des ascites.

Nous avons montré que les hospicells et les cellules cancéreuses de l'ovaire expriment et sécrètent IGF-I.

Nous avons également montré que le facteur de croissance IGF-I est impliqué dans la régulation des gènes ABC (*MDR1*, *MRP1*, *MRP2* et *MRP3*) très actifs dans la chimiorésistance, via les voies de signalisations STAT3, PI3K, JAK2 et MEK dans les cellules du cancer de l'ovaire.

Une co-culture entre les cellules du cancer de l'ovaire et les hospicells, induit une chimiorésistance des cellules tumorales contre la carbopltine et taxol. Cette chimiorésistance est amplifiée par IGF-I et diminuée en inhibant son récepteur IGF-IR. A l'inverse, lorsqu'il n'y a pas de contact hospicells-cellules tumorales, et que ces dernières ne sont qu'en présence de surnageant des hospicells, les cellules cancéreuses ne résistent que légèrement aux agents de la chimiothérapie, et ce, avec ou en absence de IGF-I.

Ces résultats suggèrent que la chimiorésistance des cellules tumorales de l'ovaire est plus importante lorsqu'il y a une synergie des effets induits par un niveau suffisant de IGF-I, sécrété par le microenvironnement, et par l'interconnexion hospicells-cellules tumorales.

# **Ovarian ascites-derived hospicells promote up regulation of the ATP-binding cassette genes by Insulin-like Growth Factor-I via JAK-STAT3, MEK signaling pathway in ovarian cancer cell line**

Nadia Benabbou, Pezhman Mirshahi, Dalel Azazzene, Mélodie Cadillon, Jeannette Soria, Amu Therwat, Massoud Mirshahi\*

National Institut for Medical Research (INSERM), Cordeliers Research Center (UMRS 872),  
University of Pierre and Marie Curie, and University of Paris Descartes.

**Running Title:** Hospicells promote up regulation of ABC genes by IGF-1in ovarian cancer

**Key words:** IGF-1, JAK-STAT3, MEK, PI-3Kinase Signaling pathway, ATP Binding Cassette, Hospicells, chemoresistance, ovarian cancer,

\*Corresponding Author:

M. Mirshahi, M. D., Ph. D. INSERM UMRS 872,  
Université Pierre et Marie Curie, Paris-VI,  
Université Paris Descartes, Paris-V,  
15 Rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France.  
TEL (33) 1 42 34 69 31  
FAX (33) 1 43 25 63 44;  
E-mail: [massoud.mirshahi@upmc.fr](mailto:massoud.mirshahi@upmc.fr)

## Abstract

Interaction between tumor cells and their microenvironment have a crucial role in the development, progression and drug resistance. Our research objective was to confirm the role in drugs resistance and tumor cell growth of hospicells, which are stromal cell from cancer microenvironment. We demonstrated that soluble factors secreted by hospicells activate several genes and favour JAK-STAT signaling pathway in ovarian cancer cell lines. Hospicells express all insulin like growth factor (IGF) family as detected by gene array, RT-PCR, protein array and immunocytochemistry. However, whether IGF-I is secreted by hospicells was not clear. While focussing attention on the microenvironment, we considered the role of IGF-I in proliferation and survival of ovarian cancer cells. Indeed IGF-I is a major actor in modulating different stages of cancer development. We studied the effect of exogenously added IGF-I on the regulation of ATP binding cassette ABC gens (*MDR1*, *MRP1*, 2, 3, 5 and *BCRP*) in the ovarian cancer cell line (OVCAR3) and confirmed the results obtained making use of the IGF-IR antagonist, picropodophyllin. IGF-1 regulates the expression of ABC genes in OVCAR3 cells via PI3-Kinase, MEK and JAK2-STAT3 signaling pathways. OVCAR3 cell line when co-cultivated with hospicells, showed marked degree of drugs resistance development. This drugs resistance could be amplified if IGF-I was exogenously added. Addition of IGF-IR inhibitor however reduced the degree of resistance in these exposed cells. At the same time cells treated with anti cancer drugs but then exposed to IGF-I showed an increase in drugs resistance and thereby increase in cell survival. This observation indicates that drug resistance of OVCAR3 cells increases when there is synergy between OVCAR3 cells and hospicells and it is amplified when IGF-I was exogenously added. In conclusion, inhibition of IGF-IR and targeting of JAK-Stat signaling pathway can be a target for ovarian cancer therapy.

## Introduction

The tumor microenvironment has been largely studied as a dynamic system orchestrated by several growth factor as Insulin like Growth Factor-I (IGF-I) (Uchiyama *et al*, 1993; Chauhan *et al*, 1996; Dankbar *et al*, 2000; Gupta *et al*, 2001). IGF-I functions by autocrine and/or paracrine effect, in physiological and pathological processes, but is also involved in development and progression of several cancers as ovarian cancer (Druckmann, and Rohr, 2002). High levels of free IGF-1 and IGF-1 activity are associated with elevated risk of progression in ovarian cancer (Brokaw *et al*, 2007). In Plasma, IGF-1 binds mainly to the IGF binding protein, IGFBP-3 (Holly and Perks, 2006). Ovarian cancer is the sixth most frequent tumors in women and the first cause of death from the gynaecological cancers in the world (Jemal *et al*, 2008). The efficiency of treatments is often hindered due to emergence of multi resistance (MDR). The microenvironment surrounding the tumor plays a significant role in MDR development Rafii *et al*, 2008 and also in the progression and metastasis. Peritoneal homeostasis is influenced by growth factors and stromal cells. The peritoneal stromal cells present in ascetic fluids of ovarian cancer have been shown to stimulate cell growth (Sako *et al*, 2003; Wilson, 1989). A distinctive population of stromal cells forming the tumor microenvironment of floating cell aggregates from ascitic fluid was identified and isolated for the first time in our laboratory and named “Hospicells” (Rafii *et al*, 2008, Pasquet *et al*, 2008, Lis *et al*, 2010, Martinet *et al*, 2010, Castells *et al*, 2012). The hospicells have been shown confer drug resistance to cancer cells during chemotherapy by trogocytosis (cell-cell contact). At present we provide data demonstrating that IGF-1 up regulates MDR1, *MRP1*, *MRP2* and *BCRP* from of ATP binding cassette gene family via PI3-Kinase, MEK and JAK- STAT3 pathway. Hospicells and ovarian cancer cells are mutually synergic in the presence of each other for the development of multi drugs resistance.

## Material and Methods

### 1. Cell Culture

#### *cell lines*

The cell line of human ovarian adenocarcinoma (OVCAR3) was from the American Type Culture Collection (ATCC). OVCAR3-eGFP cells, genetically modified by lentiviral vector encoding eGFP (Genethon, Evry), were also used in this study. These two cell lines were maintained in culture using RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine and 50 Units /ml antibiotics (penicillin and streptomycin) and incubated at 37 °C in an atmosphere humidified with 5% CO<sub>2</sub>.

#### *Hospicells isolated from ascites*

The Hospicells were isolated from ascites of patients with ovarian cancer at stage III. These cells were obtained according to the protocol described in the article by Rafii *and al.* (2008). These hospicells were immortalized with T antigen of the SV-40 virus (P-BABE largeT SV40, Addgene, USA) and were named M16 cells. The M16 cells were grown in RPMI-1640 medium at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

#### *Preparation of supernatant from hospicells (M16 cells)*

M16 cells (10<sup>6</sup> cells / ml of culture medium) were incubated for 24 hours at 37° C in RPMI without FBS. After incubation, the supernatant was collected and stored at -80° C. The supernatant was studied for its effect on resistance of OVCAR3 cells against chemotherapy drugs in the presence of IGF-I or in the presence of inhibitor of IGF-IR, called cycloolignan picropodophyllin (PPP).

### 2. Treatment of OVCAR3 cells with IGF-I and inhibitor of signaling pathways

The adherent OVCAR3 cells were incubated with IGF-I (200 ng/ml) and the following inhibitors from Calbiochem (Paris, France): 1μM of picropodophyllin (an inhibitor of IGF-IR); 5μM of wortmannin (PI3 kinase inhibitor), 5μM of rottlerin (PKC inhibitor); 5μM of PD98059 (MEK inhibitor), 5μM of Jak2 inhibitor and 5μM of STAT3 inhibitor.

### 3. Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)

Total RNA was extracted with the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel EURL, Hoerd, France). Reverse transcription was performed using M-MLV reverse transcriptase and oligo (dT) primers (Gibco, Paisley, UK). The polymerase chain reaction (PCR) was performed by *Taq* DNA polymerase (Gibco-BRL, Paisley, UK). Specific primers for *IGF-I*, (sense : 5'-AAA TCA GCA G TC TTC CAA C-3', antisense : 5'-CTT CTG GGT CTT GGG CAT GT-3'; *IGF-II* (sense : 5'-AGT CGA TGC TGG CTT CTC A-3', antisense : 5'-GTG GGC GGG GTCT TGG GTG GGT AG-3'); *IGF-IR* (sense : 5'-GAC ATC CGC AAC GAC TAT CAG-3', antisense : 5'-GTA GTT ATT GGA CAC CGC ATC-3'); *IGF-IIR* (sense : 5'-TAC AAC TTC CGG TGG TAC ACC A-3', antisense : 5'-CAT GGC ATA CCA GTT TCC TCC A-3'); *MDR1*(5'-GTT ATA GGA AGT TTG AGT TT-3' and antisense : 5'-AAA AAC TAT CCC ATA ATA AC-3'); *MRP* (5'-AAT GCG CCA AGA CTA GGA AG -3' and antisense 5'-ACG GGA GGA TGT TGA ACA AG-3'); *MRP2* (sense : 5'- CTG GTT GAT GAA GGC TCT GA-3', antisense : 5'-CTG CCA TAA TGT CCA GGT TC-3'); *MRP3* (sense : 5'-GCA GGT GAC ATT TGC TCT GA-3' antisense : 5'- CCC TCT GAG CAC TGG AAG TC-3'); *MRP5* (sense : 5'-GGA TAA CTT CTC AGT GGG- 3', antisense : 5'-GGA ATG GCA ATG CTC TAA AG-3') ; *BCRP* (sense : 5'-TTA GGA TTG AAG CCA AAG G-3', antisense : 5'-TAG GCA ATT GTG AGG AAA ATA-3') and  *$\beta$ 2-microglobulin* (sense : 5'-CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC-3', antisense : 5'-GAT GCT GCT TAC ATG TCT CG-3'). The PCR products, along with a 100-bp DNA ladder, were analysed by electrophoresis on agarose gels containing ethidium bromide.

### 4. IGF Protein expression by OVCAR3 cells

The presence of proteins belonging to IGF family in OVCAR3 cells was revealed by immunocytochemistry. OVCAR3 were seeded at 20,000 cells / well in glass bottom chamber slides (Lab-Tek, Nunc, Naperville, USA). The cells were then permeabilized and incubated for 2 h at room temperature with either specific primary antibodies (dilution 1/200) anti-IGF-I, -II, -IR or -IIR (R & D Systems, Minneapolis, USA). After several washes, cells were incubated successively with biotinylated secondary antibody and streptavidine coupled to fluorescein isothiocyanate (dilution 1/500), for 45 min. Isotypic controls were performed concurrently and nuclei were DAPI-labeled. The cells were then visualized by fluorescence microscopy.

## **5. Analysis by Gene Array of genes expression in OVCAR3 cells incubated in the hospicells supernatant**

Expressions of several genes were analysed by gene microarray (Microarray PIQOR; Miltenyi Biotec. GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) in OVCAR3 cells incubated in the hospicells supernatant for 8 h at 37°C.  $5 \times 10^6$  of OVCAR3 cells were lysed with Trizol® reagent (Invitrogen, Carlsbad, USA) and sent to Miltenyi Biotec GmbH in dry ice. The gene array experiment was performed according to the protocol of Ducros *et al.*, 2007. Expressions of IGF-I, IGF-II, IGF-IR, IGF-IIR and IGFBP 1, 2, 3, 4, 6, 10 genes were also studied by gene array.

## **6. Quantitative Analysis by protein Array of IGF family proteins secreted by M16 cells**

We analysed the supernatant of M16 cells to measure the amount of IGF family proteins (IGF-I, IGF-II, IGF-IR and IGF-IIR) using protein array technology (Human Cytokine Antibody Array, Ray Biotech, Norcross, GA). This technique is based on the principle of ELISA. Membranes on which 174 anti-cytokines were fixed with appropriate controls were used. The M16 cell supernatant, prepared above, contained proteins that were linked with their specific antibodies attached to the membrane. The membrane was saturated for 2 h with BSA at room temperature to block nonspecific sites. Then, the M16 cell supernatant was incubated overnight at 4° C with antibodies specific for IGF-I, IGF-II, IGF-IR. After several washes, the membranes were incubated with a mixture of biotinylated secondary antibodies overnight at 4° C. Streptavidin coupled to HRP was added to the membranes, while being incubated for 2 h at room temperature.

The presence of a proteins coupled to the antibody was revealed using the ECL reagent membrane (Enhanced Chemiluminescence, GE Healthcare Europe, Saclay, France). The membrane was dried and then exposed on a photographic film (Amersham Biosciences, Montigny-le-Bretonneux, France) before being developed (Kodak X-OMAT Processor 1000). The ImageJ software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, USA) was used to quantify the intensity of the spot and compared to control experiments.

## **7. Studies of drug resistance of OVCAR3-eGFP cells in the presence of Hospicells**

The hospicells were seeded first at 60% confluency in a 96-well flat-bottomed cells-culture plate in the presence of complete medium containing 10% FBS. After 18 hours incubation, the OVCAR3-



eGFP cells (10 000 cells / well) were added and co-cultured for 24 h with hospicells in the presence of IGF-I (200 µg/ml) or IGF-IR inhibitors : (PPP 1µM) or (siRNA, 10nM- HiPerFect, Qiagen, Courtaboeuf, France) before addition of 22.2 µM carboplatin or 1.4 µM paclitaxol (Smith *et al.*, 2005). The effect of these cytotoxic agents was evaluated quantitatively using a GFP fluorescence reader (Wallac, Perkin&Elmer, Waltham, USA). The same experiment was also performed on OVCAR3 cells incubated in the presence of supernatants of hospicells as described above. The result is representative of three independent experiments.

## **7. Statistical analyses**

The results are presented as mean  $\pm$  SE and data was analysed using student test P value <0.05 was considered significant.

# **Results**

## **1. Effect of conditioned medium from hospicells on OVCAR3.**

The aim of this experiment was to study the effect of conditional medium from hospicells on the regulation of selected gens in OVCAR3 cells *in vitro* by gene array. The major genes up or down regulated after interaction of soluble factors secreted by hospicells on ovarian cancer cells are presented in table 1. Several genes including those for cytokine and cytokine receptors such as PDGFB, TNFSF5, VEGF-2, GPR17, gpl 130 (IL6 ST), IGFBP10 and ABCc10 (MRP-7), are up-regulated. Curiously, the amount of several genes encoding for transcription factors such as RASA4, STAT2, STAT6, IRF4, and MARK3 were found increased. In contrast, the expression of IL2, IL13, PAR3, ABCB3 (MDR-3) were decreased. In a parallel study using code genes for all up regulated mRNAs in a database for annotation, visualization and integrated discovery (DAVID) v6.7 analysis, JAK-STAT signaling pathway was suggested.

## **2. Expression of IGF related proteins by hospicells .**

In the previous experiments, we observed that the conditional medium of hospicells regulate of MRP-7 and MDR-3 mRNA expression after 8h incubation with OVCAR3 cell line. Because of the importance of IGF signaling pathway in cancer cell proliferation and metastasis, we concentrated our works on IGF family. Gene array, protein array, RT-PCR and immunocytochemistry methods used for detection of IGF related family in Hospicells. All results are resumed in table 2. IGF-I, IGF-II, IGF-IR, IGF-IIR and IGFBP 1, 2, 3, 4, 6 and 10 were detected in gene array. The expressions of all proteins were confirmed by protein array. RT-PCR was used to detect the presence of mRNA of IGF family members (IGF-I, IGF-II, IGF-IR and IGF-IIR) in hospicells isolated from ascites of patients with ovarian cancer and  $\beta$ 2-microglobuline was implied as a control. Figure 1-A shows that Hospicells (M16 cells) express *IGF-I*, *IGF-II* genes as well as their receptors *IGF-IR*, *IGF-IIR*. The PCR results were confirmed by immunocytochemical analysis using specific antibodies for IGFs and their receptors (Figure 1-B). These results showed that several member of IGF family were expressed by hospicells.

## **3. IGFs and their receptors expressed in the ovarian cancer cell line and implicated in cell proliferation**

The presence of IGF-I, IGF- II and their receptors IGF-IR and IGF-IIR proteins in ovarian cancer cell line OVCAR3 has been determined by immunofluorescence analysis using specific antibodies. IGF-I, IGF-II and IGF-IR are expressed at significant levels in OVCAR3 cell lines (Figure 2-A). In contrast, the immunofluorescence of the IGF-IIR was low, indicating that these cells express the receptor rather weakly. In parallel, we studied, using the MTT technique, the effect of the growth factor IGF-I on OVCAR3 cell proliferation. This experiment was performed in serum-free medium to avoid skewing the results of the study. We also investigated whether inhibition of IGF-IR with picropodophyllin (PPP) decreased OVCAR3 cell proliferation. The result in Figure 2B shows that OVCAR3 cells are sensitive to the effect of IGF-I and their proliferation increases at time 48h. We also found that inhibition of IGF-IR, indispensable for transmitting the effects of IGF-I on cells, leading to a strong reduction in the growth and proliferation of OVCAR3 cells.

#### 4. Expression of ABC genes in OVCAR3 cells

ABC transmembrane proteins play an important role in drug resistance of cancer cells because they expel from the cells the anticancer drugs. Indeed, over-expression of ABCB1 (*MDR1* gene and its P-gp protein) has been directly involved in the phenomenon of multidrug resistance *in vitro*. Ovarian cancer cell line OVCAR3 is characterized by an average degree of aggressiveness. We sought to determine the expression of ABC genes by OVCAR3 cells with RT-PCR using primers specific for *MDR1*, *MRP1*, *MRP2*, *MRP3*, *MRP5* and *BCRP* (see Material and Methods). The amount of mRNA for  $\beta$ 2-microglobuline was also analyzed to normalise the results. The results in Figure 3 show that OVCAR3 cells do not express *MDR1* and *MRP2* genes at a significant level. The expression of *MRP1* and *MRP3* is above basal levels whereas expression of *MRP5* and *BCRP* genes are strong. The results shown also in Figure 3 present the expression of ABC genes when the OVCAR3 cells treated with IGF-1. In the presence of the inhibitor PPP, the expression of the gene *MDR1* disappears. We obtained a similar result for the expression of *MRP2*. We also found that IGF-I increases the expression of genes *MRP3* and *MRP1*. This expression is greatly reduced in the presence of the inhibitor of IGF-IR when compared to control cells. In contrast, there was no significant difference in expression of *MRP5* and *BCRP* in the presence of IGF-I or PPP compared to control cells. This suggests that MRP-1 and MRP-3 gene promoters are activated by the IGF-I pathway. The intensity of bands in each experiment was evaluated using ImageJ. The results were normalised with the expression of the mRNA of  $\beta$ 2-microglobuline.

#### 5. IGF-1 regulate the expression of ABC genes in OVCAR3 cells by PI3-Kinase, MEK and JAK2-STAT3 pathways

To elucidate the mechanism of drug resistance facilitated by the expression of ABC genes in OVCAR3 cells in the presence of IGF-1 or its absence (negative control), we tested the effects of five inhibitors of signaling pathways: rottlerin (PKC inhibitor), wortmannin (PI3 kinase inhibitor), PD98059 (MEK inhibitor), Jak2 inhibitor and STAT3 inhibitor. ABC gene expressions were induced at levels different by IGF-I (Figure 4). Indeed, the inhibitor PD98059 decreased the expression of three ABC genes *MDR1*, *MRP1* and *MRP2*. The inhibitor Wortmannin in the presence of IGF-I inhibits completely the expression of *BCRP* and *MRP2* in OVCAR3 cells and. Jak 2 inhibitor also reduces the expression of *MDR1* and *MRP2*. Our attention has been retained by the effect of the STAT3 inhibitor on expression of *MDR1* and *MRP1*. The expression of these

genes was totally inhibited by the addition of STAT3 inhibitor. This is important since *MDR1* and *MRP1* are known for their role in the resistance of ovarian cancer against chemotherapy, including carboplatin and taxoplatine. In contrast, no difference in *MRP3* and *MRP5* genes expression was observed in the presence of various inhibitors as compared to OVCAR3 control cells incubated only with IGF-I.

## **6. The effect of IGF-I on drug resistance of OVCAR3 cells with conditioned medium from hospicells**

Inhibition of IGF-IR (or signaling pathways activated by this receptor) can alter ABC gene expression, mainly *MDR1*. The OVCAR3 cells were incubated in a serum free medium (control cells) or with supernatants of hospicells in the presence of IGF-I or PPP. The incubation of OVCAR3 with hospicells supernatants was carried out in the presence (or absence) of carboplatin or taxol. The aim was to study the effect of IGF-I on the resistance of OVCAR3 cells to these chemotherapeutic agents.

The results in Figure 5-A show that proliferation of OVCAR3 cells is greater in the presence of IGF-I as compared to control cells and decreases when the inhibitor PPP is present. These observations confirm our previous results shown above in Figure 2-B. The increase in proliferation OVCAR3 cells due to the presence of IGF-I diminishes however when taxol or carboplatin were added.

We found also that, in the presence of hospicells supernatants (Figure 5B), the OVCAR3 cells showed increase in proliferation compared to control cells. This proliferation was amplified in the presence of IGF-I and clearly decreased in the presence of PPP. This suggests that the hospicell supernatants contain most probably other growth factors in addition to IGF-I that have an effect on tumor cells.

In the presence of IGF-I and hospicell supernatants as compared to controls, a small number of OVCAR3 cells survived, and therefore resisted the action of carboplatin or taxol action

## **7. Co-culture of OVCAR3-GFP and hospicells in the presence of IGF-I and induction of drug resistance**

OVCAR3 cells transfected with a fluorescent protein (OVCAR3-GFP) were co-cultured with hospicells in the presence or absence of IGF-I or PPP for 24 hours at 37°C. An increase in

OVCA3-GFP cell proliferation was observed when co-cultured with hospicells, compared with control cells, provided they were not exposed to the chemotherapeutic agents, carboplatin or taxol. The proliferation rate increased with addition of IGF-I and decreased in the presence of added inhibitor PPP (Figure 6). We also used siRNA anti-IGF-IR in the same conditions and in place of PPP. Addition of siRNA instead of PPP further decreases drug resistance and therefore inhibited cell survival and proliferation (Figure 6).

## Discussion

The tumor microenvironment is composed of endothelial cells, fibroblasts associated with cancer (FCA), adipocytes, smooth muscle cells and cells of the immune and inflammatory systems. These cells communicate with each other, as well as tumor cells, via cytokines and growth factors such as VEGF, IGF-I, FGF, IL-8 etc (Kucerova and Skolekova, 2013). Many studies show the role of the stromal cells in the microenvironment and their involvements in drug resistance of tumor cells. In these studies, a set of stromal cells, called host cells or "hospicells" (Rafii *et al.*, 2008), have been identified and purified from cell aggregates of ascites of patients with ovarian cancer. Hospicells interact with the ovarian tumor cells and play a role in chemoresistance of these cells by a trophic mechanism (Rafii *et al.*, 2008). Furthermore, an *in vivo* study showed that hospicells promoted the proliferation and angiogenesis of cells in ovarian cancer (Pasquet *et al.*, 2010).

Because of the important role of stromal microenvironments in cancer cell behaviors, we set to demonstrate first of all that the conditioned medium from hospicells activate several genes (table 2) and favors JAK-STAT signaling pathway in ovarian cancer cell lines. Up-regulation of MRP7 (ABCC10) and down regulation of MDR3 (ABCB3) suggests that the soluble factors secreted by cancer cell microenvironment can be involved in drug resistance in cancer cells. Expression of VEGFB confirmed previous observation of the role of hospicells in angiogenesis (Pasquet *et al.*, 2010). However, more elaborate studies are required for identifying the bioactive molecules in question. Among the molecules secreted by the tumor microenvironment, the growth factor IGF-I plays an important role in development and progression of various human cancers. And also in the inhibition of apoptosis (Beauchamp *et al.*, 2010). Elevated plasma concentrations of IGF-I has been linked to a high risk for several types of cancers including breast, prostate and lung cancer

(Belfiore and Frasca, 2008; Weiss *et al.*, 2007). In this study, using several techniques (table 2) we showed that hospicells secrete IGFs and IGF related proteins. Also hospicells were shown earlier (Rafii *et al.*, 2008) to express ATP binding cassette mRNA and proteins except MRP-5.

Given the importance of the growth factor IGF-I in the interactions of tumor cells with stromal cells in the microenvironment, in the present work, we wanted to investigate a possible involvement of this growth factor in the regulation of ABC gene expression (*MDR1*, *MRP1*, *MRP2*, *MRP3*, *MRP5* and *BCRP*) and to study its impact on the resistance of OVCAR3 cells in the presence of hospicells against carboplatin and or taxol. The results we obtained indicated that OVCAR3 cell line: 1) expressed IGF-I and IGF-IR proteins. These results were confirmed in other study by Gotlieb and collaborators (2006). 2) OVCAR3 cells do not express *MDR1* and *MRP2* genes at a significant level. The expression of *MRP1* and *MRP3* was above basal levels whereas expression of *MRP5* and *BCRP* genes were strong. 3) IGF-I is involved in the regulation of ABC gene expression (*MDR1*, *MRP1*, *MRP2* and *MRP3*) but not *MRP5* and *BCRP*. 4) The expression of these ABC genes, usually regulated by IGF-I, is decreased when the IGF-IR is inhibited. 5) The modulation of ABC genes expression by IGF-I is provided by STAT3, MEK, Jak2 and PI-3K signaling pathway. In contrast, 6) The expression of *MRP5* gene, in contrast, is not regulated by signaling pathways activated by IGF-I. As such, it may be well to consider intensifying the research on the signaling pathway of STAT3, in view of its importance in many cancers (Grivennikov and Karin, 2008). Gest *and collaborators* (2012) showed that inhibition of STAT3 was a promising approach to reduce the aggressiveness of the ovarian cancer cells. Cytokines has been shown mediated reversal of multidrug resistance as has been reported by several authors (Walther and Steine, 1999). Interferon- $\alpha$  up-regulates MDR-1 mRNA and P-gP expression in ovarian cancer (Kang and Perry, 1994), and also MRP mRNA is up-regulated in colon cancer by TNF- $\alpha$  (Stein et al 1997). Interestingly, both these cytokines as well as IGF-1 use JAK-STAT pathway signaling for the up-regulation of MDR. On the other hand, another study indicated that PI3K signaling is involved in BCRP expression and inhibiting this pathway resulted in increased intracellular accumulation of chemotherapeutic drugs and cytotoxicity in tumor cells (He *et al.*, 2008; Fischer *et al.*, 2012). We observed the effect of IGF-I on proliferation of the OVCAR3 cell line in serum-free conditions and protection of the cells from cytotoxic effects of carboplatin or taxol as it was observed with doxorubicin in MCF7 human breast cancer (Zatelli *et al.*, 2009) and

carboplatin in ovarian cancer (S E. Johnatty, *et al* 2012). The previous reports (Siddik *et al* 2003, wang *et al* 2005, Helen *et al* 2010) favor a partial involvement of ABC proteins (MRP2) in drugs resistance with platinum derived agents. It is well known that platinum derivatives act on multiple signal transduction pathways through mechanisms including glutathione regulation, reduction of drug transport and increased DNA adduct tolerance and repair. Here, we observed that increase of ABC protein expressions in OVCAR3 or OVCAR3-hospicells after incubation with IGF-1 induces the resistance to carboplatin derived agents. This resistance can be produced by other mechanism such as DNA repair independent of the up-regulation of ABC proteins. We also evaluated the role of IGF-I on drug resistance acquired following the interaction of OVCAR3 cells and hospicells. At first, our results showed that, in the absence of the drug, the very presence of hospicells in culture medium increases the proliferative ability of ovarian cells, which can be explained by enrichment of the medium by growth factors. We observed, however that hospicells express the growth factor IGF-I but it secretes it only at low levels *in vitro*. This can be explained by the presence of IGFBP-3 which is highly secreted by hospicells (results not shown) and which is capable of IGF-I sequestering. It is possible that hospicells do not secrete metalloproteinase MMP-9 (Pasquet *et al*, 2010), which normally cleaves the complex IGF-I-IGFBP-3 and allows the release of IGF-I. The proliferative ability of ovarian cell line is significantly increased in the presence of IGF-I and decreases if IGF-IR is inhibited. Furthermore we confirmed that contact between hospicells and ovarian cancer cells was important for the acquisition of drug resistance by OVCAR3-GFP cells and which of course increased in the presence of IGF-I. We then added inhibitors of IGF-IR, PPP and siRNA, and observed a decrease in the drug resistance of OVCAR3-GFP cells. The decrease was pronounced with the siRNA. In this system, IGF-1R/siRNA is not the good inhibitor candidate, because of its non specificity related to drug treatment. This suggests that IGF-I is not the only factor to influence the mechanism of drug resistance, but there perhaps, other factors that are secreted by hospicells, but the mode of action remains to be elucidated. A more indepth study is needed to understand the impact of interactions between hospicells and tumor cells in the presence of other growth factors.

When there is no contact between hospicells-OVCAR3 cells (in the presence of hospicells supernatant), as compared to controls, OVCAR3 cells resist treatment by carboplatin or taxol action and show low survival. Up-regulation of MRP-7 and JAK-Stat signaling pathway and down

regulation of MDR-3, can also be implicated in these phenomena. Our results suggest that drug resistance in tumor cells is higher when there is a synergy of effects induced by a sufficient level of IGF-I, secreted by the microenvironment, and intimate contact between hospicells and cancer cells.

This synergy could be due to the interplay of different mechanisms. First, IGF-I, secreted by the microenvironment is involved through autocrine and paracrine action in the regulation of expression of ABC genes in OVCAR3 cells. However, we suppose that IGF-I is also involved in the regulation of ABC genes present in hospicells. Further work is necessary to determine whether IGF-I actually regulates these genes, and at which level the regulation occurs need to be investigated in any future study. Other data (Grothey *et al.* 1999) suggest that the anti-apoptotic effect of IGF-I may intervene in the decreased sensitivity to chemotherapeutic drugs *in vitro* and *in vivo*. Thus, targeting the IGF-I/IGF-IR system could serve as an approach to overcome clinical drug resistance in certain tumors. In conclusion, inhibition of IGF-IR and modulation of JAK-STAT signaling pathway can be an approach worth considering in the therapy of ovarian cancer.

## References

1. Beauchamp MC, Yasmeeen A, Knafo A, Gotlieb W H: Targeting Insulin and Insulin-Like Growth Factor Pathways in Epithelial Ovarian Cancer. *J Oncol* 2010;257058, 2010
2. Belfiore A, Frasca F: GF and insulin receptor signaling in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 13(4):381-406, 2008
3. Brokaw J, Katsaros D, Wiley A, Lu L, Su D, Sochirca O *et al.* : IGF-I in epithelial ovarian cancer and its role in disease progression. *Growth Factors* 25 pp. 346–354, 2007
4. Castells M, Thibault B, Mery E, Golzio M, Pasquet M, Hennebelle I, Bourin P, Mirshahi M, Delord JP, Querleu D, Couderc B. Ovarian ascites-derived Hospicells promote angiogenesis via activation of macrophages. *Cancer Lett.* 29;326(1):59-68. 2012.
5. Chauhan D, Uchiyama H, Akbarali Y, Urashima M, Yamamoto K, Libermann TA & Anderson KC: Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 87,1104–1112, 1996



6. Dankbar B, Padro T, Leo R, Feldmann B, Kropff M, Mesters RM, Serve H, Berdel WE & Kienast J : Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 95, 2630–2636, 2000
7. Druckmann R, Rohr UD : IGF-1 in gynaecology and obstetrics: update 2002. *Maturitas* 41 pp. S65–S83, 2002.
8. Ducros E, Berthaut A, Mirshahi SS, Faussat AM, Soria J, Agarwal MK, Mirshahi M. Aldosterone modifies hemostasis via upregulation of the protein-C receptor in human vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun.* 22;373(2):192-6, 2008.
9. Fischer B, Frei C, Moura U, Stahel R, Felley-Bosco E : Inhibition of phosphoinositide-3 kinase pathway down regulates ABCG2 function, and sensitizes malignant pleural mesothelioma to chemotherapy. *Lung Cancer* 78 23– 29, 2012
10. Garcia-Echeverria C, Pearson MA, Marti A, Meyer T, Mestan J, Zimmermann J, Gao J, Brueggen J, Capraro HG, Cozens R, Evans DB, Fabbro D, Furet P, Porta DG, Liebetanz J, Martiny-Baron G, Ruetz S & Hofmann F : *In vivo* antitumor activity of NVP-AEW541-A novel, potent, and selective inhibitor of the IGF-IR kinase. *Cancer Cell* 5, 231–239, 2004
11. Gest C, Mirshahi P, Li H, Pritchard LL, Joimel U, Blot E, Chidiac J *et al.* : Ovarian cancer: Stat3, RhoA and IGF-IR as therapeutic targets. *Cancer Lett* 28;317(2):207-17, 2012
12. Gotlieb WH, Bruchim I, Gu J, *et al.* : Insulin-like growth factor receptor I targeting in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 100(2):389–396, 2006
13. Grivennikov S, Karin M : Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? *Cancer Cell* 13(1):7-9, 2008.
14. Grothey A, Voigt W, Schöber C, Müller T, Dempke W, Schmoll HJ : The role of insulin-like growth factor I and its receptor in cell growth, transformation, apoptosis, and chemoresistance in solid tumors. *J Cancer Res Clin Oncol* 125(3-4):166-73, 1999
15. Guo YS, Jin GF, Houston CW, Thompson JC, Townsend CM Jr : Insulin-like growth factor-I promotes multidrug resistance in MCLM colon cancer cells. *J Cell Physiol* 175:141–148, 1998
16. Gupta D, Treon SP, Shima Y, Hideshima T, Podar K, Tai YT, Lin B *et al.*: Adherence of multiple myeloma cells to bone marrow stromal cells upregulates vascular endothelial growth factor secretion: therapeutic applications. *Leukemia*, 15, 1950–1961, 2001

17. He Y, Zhang J, Zheng J, Du W, Xiao H, Liu W, Li X, Chen X, Yang L, Huang S. The insulin-like growth factor-1 receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, suppresses survival and resistance to chemotherapy in acute myeloid leukemia cells. *Oncol Res.* 2010;19(1):35-43
18. Helen H. W. Chen<sup>1</sup> and Macus Tien Kuo<sup>2,\*</sup> Role of Glutathione in the Regulation of Cisplatin Resistance in Cancer Chemotherapy Met Based Drugs. 2010; 2010: 430939.
19. Hirsch-Ernst KI, Ziemann C, Schmitz-Salue C, Foth H, Kahl GF: Modulation of P glycoprotein and *mdr1b* mRNA expression by growth factors in primary rat hepatocyte culture. *Biochem Biophys Res Commun* 215:179-185, 1995
20. Holly J, Perks C. The role of insulin-like growth factor binding proteins. *Neuroendocrinology.* 83(3-4):154-60, 2006.
21. Hu C, Li H, Li J, Zhu Z, Yin S, Hao X, *et al.* : Analysis of ABCG2 expression and side
22. Jemal A, Thun MJ, Ries LA, Howe HL, Weir HK, Center MM, Ward E, Wu XC, Ehemann C, Anderson R, Ajani UA, Kohler B, Edwards BK: Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J Natl Cancer Inst* 3;100(23):1672-94, 2008.
23. Johnatty SE, Beesley J, Paul J, Fereday S, Spurdle AB, Webb PM, Byth K, *et al.* ABCB1 (MDR 1) polymorphisms and progression-free survival among women with ovarian cancer following paclitaxel/carboplatin chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 1;14(17):5594-601, 2008
24. Kang Y, Perry RR. Effect of alpha-interferon on P-glycoprotein expression and function and on verapamil modulation of doxorubicin resistance. *Cancer Res.*1;54(11):2952-8, 1994
25. Kucerova L, Skolekova S : Tumor microenvironment and the role of mesenchymal stromal cells. *Neoplasma* 60(1):110.doi:10.4149/neo, 2013
26. Laviola L, Natalicchio A & Giorgino F: The IGF-I signaling pathway. *Current Pharmaceutical Design*, 13, 663–669, 2007
27. Lis R, Capdet J, Mirshahi P, Lacroix-Triki M, Dagonnet F, Klein C, Mirshahi M, Fournié JJ, Raffi A, Poupot M. Oncologic trogocytosis with Hospicells induces the expression of N-cadherin by breast cancer cells. *Int J Oncol.* 2010 Dec;37(6):1453-61.

28. Maiso P, Ocio EM, Garayoa M, Montero JC, Hofmann F, Garcia-Echeverría C, Zimmermann J, Pandiella A, San Miguel JF : The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor NVP-AEW541 provokes cell cycle arrest and apoptosis in multiple myeloma cells. *Br J Haematol.* May 141(4):470-82, 2008
29. Martinet L, Poupot R, Mirshahi P, Rafii A, Fournié JJ, Mirshahi M, Poupot M. Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses. *Int J Cancer.* 2010 May 1;126(9):2143-52.
30. Pasquet M, Golzio M, Mery E, Rafii A, Benabbou N, Mirshahi P, Hennebelle I, Bourin P, Allal B, Teissie J, Mirshahi M, Couderc B: Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer* 1;126(9):2090-101, 2010
31. Rafii A, Mirshahi P, Poupot M, Faussat AM, Simon A, Ducros E, Mery E, *et al.*: Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS One* 3(12):e3894, 2008
32. Sako A, Kitayama J, Yamaguchi H, Kaisaki S, Suzuki H, Fukatsu K, Fujii S, Nagawa H : Vascular endothelial growth factor synthesis by human omental mesothelial cells is augmented by fibroblast growth factor-2: possible role of mesothelial cell on the development of peritoneal metastasis. *J Surg Res* 115(1):113-20, 2003
33. Siddik ZH. Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene.*2003;22(47):7265–7279.
34. Smith JA, Ngo H, Martin MC, Wolf JK : An evaluation of cytotoxicity of the taxane and platinum agents combination treatment in a panel of human ovarian carcinoma cell lines. *Gynecol Oncol.* 98:141–145, 2005.
35. Stein U, Walther W, Lemm M, Naundorf H, Fichtner I. Development and characterisation of novel human multidrug resistant mammary carcinoma lines in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 1997 Sep 4;72(5):885-91.
36. Uchiyama H., Barut B.A., Mohrbacher,AF., Chauhan D & Anderson KC : Adhesion of human myeloma-derived cell lines to bone marrow stromal cells stimulates interleukin-6 secretion. *Blood* 82, 3712–3720, 1993

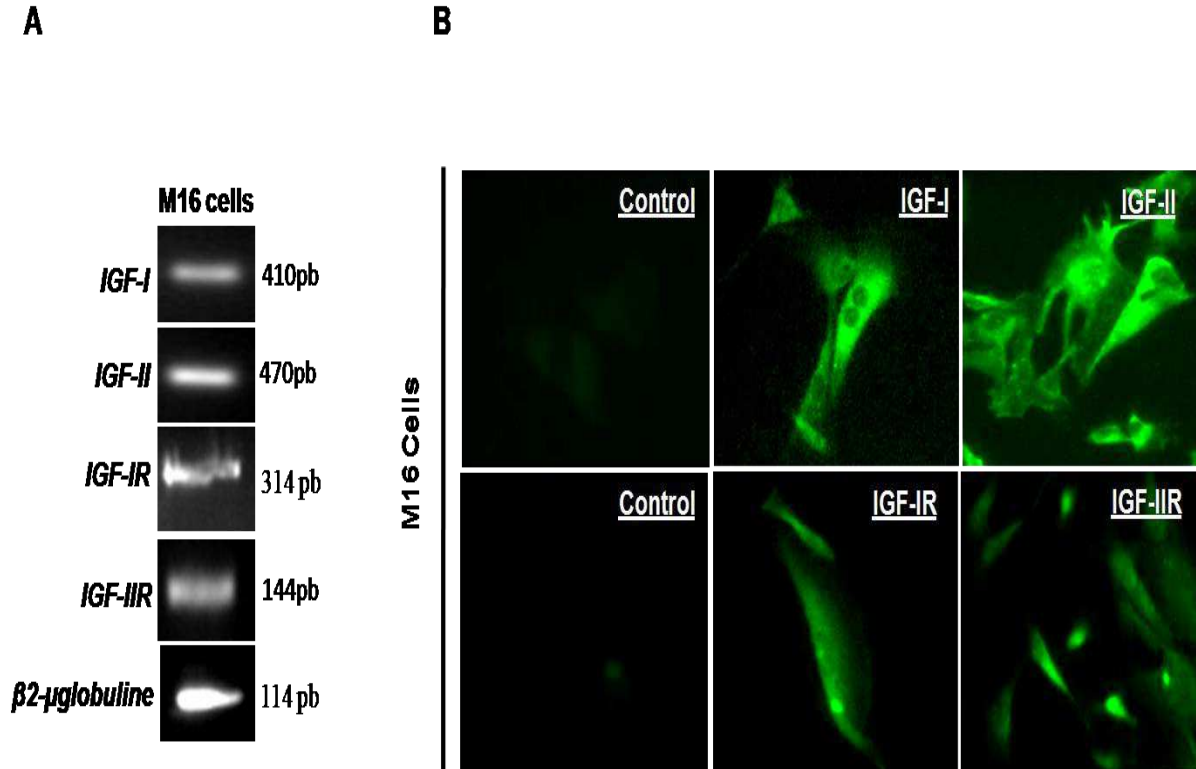
37. Walther W, Stein U. Therapeutic genes for cancer gene therapy. *Mol Biotechnol.* 1999 Nov;13(1):21-8.
38. Wang D and Lippard SJ. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nature Reviews Drug Discovery.* 2005;4(4):307–320.
39. Weiss JM, Huang WY, Rinaldi S, *et al.*: IGF-I and IGFBP-3: risk of prostate cancer among men in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. *International Journal of Cancer* 121(10):2267–2273, 2007
40. Wilson AP: Mesothelial cells stimulate the anchorage-independent growth of human ovarian tumour cells. *Br J Cancer* 59(6):876-82, 1989.
41. Zatelli MC, Minoia M, Molè D, Cason V, Tagliati F, Margutti A, Bondanelli M, Ambrosio MR, degli Uberti E : Growth hormone excess promotes breast cancer chemoresistance. *J Clin Endocrinol Metab* 94(10):3931-8, 2009
42. Zhang XY, Pettengell R, Nasiri N, Kalia V, Dalglish AG, *et al.*: Characteristics and growth patterns of human peritoneal mesothelial cells: comparison between advanced epithelial ovarian cancer and non-ovarian cancer sources. *J Soc Gynecol Investig* 6:333–340, 1999.

Genes positively regulated		Genes negatively regulated	
Reference genes	Genes name	Reference genes	Genes name
NM_002608	PDGFB (Platelet-derived growth factor B )	NM_002188	IL13 (Interleukin-13 precursor)
NM_000074	TNFSF5 (Tumor necrosis factor ligand superfamily member 5)	NM_000586	IL2(Interleukin-2 precursor)
NM_003377	VEGFB (Vascular endothelial growth factor B )	NM_004101	PAR3 (Proteinase activated receptor 3 precursor)
NM_005291	GPR17 (Putative g protein coupled receptor)	NM_000544	ABCB3 (ATP-Binding Cassette, sub-family B member 3)
NM_002184	IL6ST: (Interleukin 6 signal transducer)		
NM_006989	RASA4( RAS GTPASE-Activating protein 4)		
NM_005419	STAT2 (Signal transducer and activator of transcription 2 )		
NM_003153	STAT6(Signal transducer and activator of transcription 6 )		
NM_000629	IFNAR1 (Interferon-alpha receptor 1)		
NM_002460	IRF4: (Interferon regulatory factor 4)		
NM_002376	MARK3 (MAP/microtubule affinity-regulating kinase 3)		
NM_001554	IGFBP10 (Insulin-like growth factor binding protein 5 precursor)		
NM_033450	ABCC10 (ATP-Binding Cassette, sub-family C member 10)		

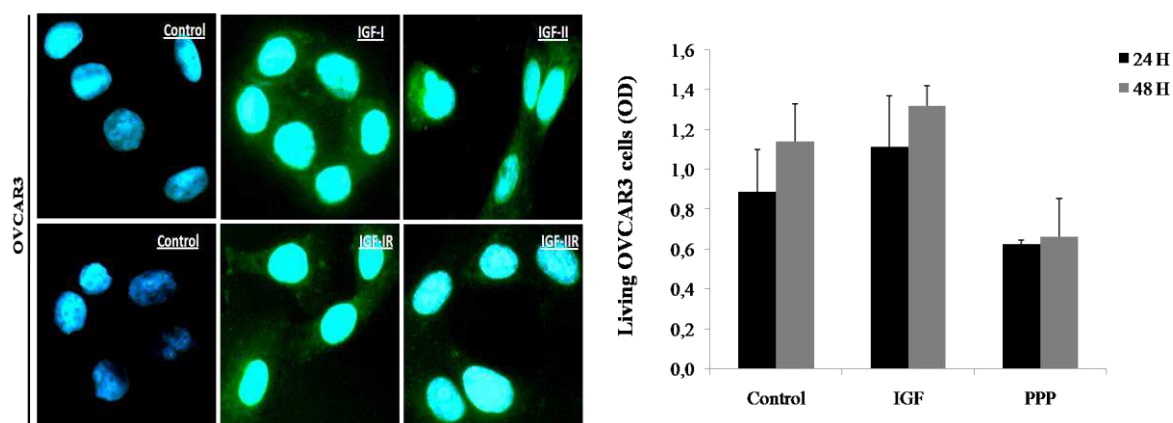
**Table 1 :** Up and down regulation of the genes activation after treatment of OVCAR3 cells by Conditional medium from hospicells in vitro.

<b>IGF protein family</b>	<b>Gene array</b>	<b>Protein array</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>IF</b>
<b>IGF-1</b>	+	+	+	+
<b>IGF-2</b>	+	+	+	+
<b>IGF-1R</b>	+	+	+	+
<b>IGF-2R</b>	+	+	+	+
<b>IGFBP-1</b>	+	+	nt	nt
<b>IGFBP-2</b>	+	+	nt	nt
<b>IGFBP-3</b>	+	+	nt	nt
<b>IGFBP-4</b>	+	+	nt	nt
<b>IGFBP-6</b>	+	+	nt	nt
<b>IGFBP-10</b>	+	nt	nt	nt

**Table-2:** Expression of IGF related proteins by hospicells using different methods such as gene array, protein array, RT-PCR analysis and immunocytochemistry. nt= not tested

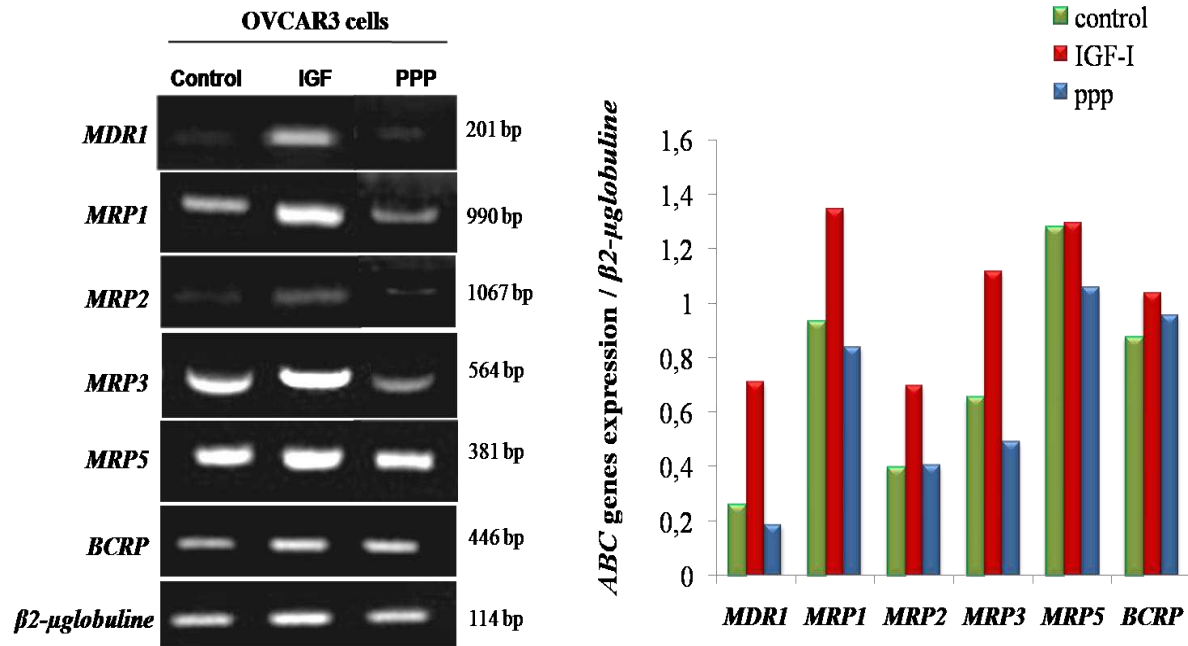


**Figure 1:** Expression of IGF components in M16 cells (Hospicells): Panel A. The mRNA expression: *IGF-I*, *IGF-II*, *IGF-IR* and *IGF-IIR* were analyzed by RT-PCR. The total RNAs of M16 cells were isolated and IGFs, IGF-R mRNAs were transcribed into cDNA (see Material and Methods). The resulting cDNAs were amplified using primers specific for *IGF-I*, *IGF-II*, *IGF-IR*, *IGF-IIR*. The mRNA expression of  $\beta$ 2-microglobuline served to normalise the results. Panel B. IGF and IGF-R proteins were detected with the use by immunocytochemistry with specific antibodies. As negative controls, M16 cells were incubated only with the secondary antibodies: anti-mouse for ligands and anti-goat antibodies for receptors.

**A****B**

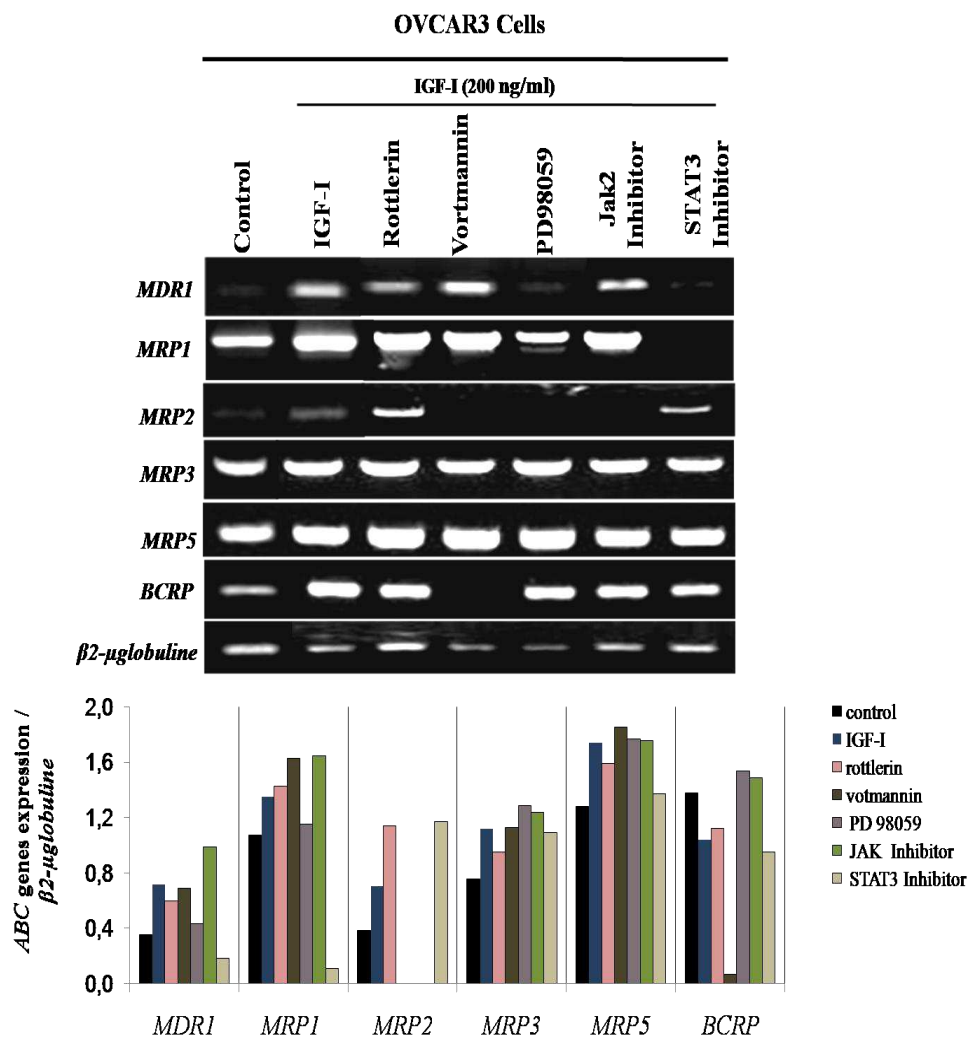
**Figure 2:** A- Expression of proteins IGFs and their receptors in OVCAR3 cells. The presence of IGF-I, IGF-II, IGF-IR and IGF-IIR proteins were studied using specific antibodies and immunocytochemical methods. The negative controls were performed using only secondary antibodies. B- Effect of IGF-1 and PPP on the proliferation of OVCAR3 cells. These cells were incubated in the presence or absence of IGF-I (control) or in the presence of PPP for 24 hours. The number of living OVCAR3 cells was quantified using the MTT technique.





**Figure 3:** Effect of IGF-I on ABC gene expression in OVCAR3 cells. OVCAR3 cells were incubated in culture medium without (control cells), the presence of IGF-I (200μg/ml culture medium) or in the presence of PPP inhibitor of IGF-IR (1μM/ml) for 12 h. Expressions of ABC genes regulated by IGF-I were analysed by RT-PCR. The intensity of bands of each experiment was evaluated using ImageJ. The results were normalised with the expression of the mRNA of *β2-microglobuline*.

A

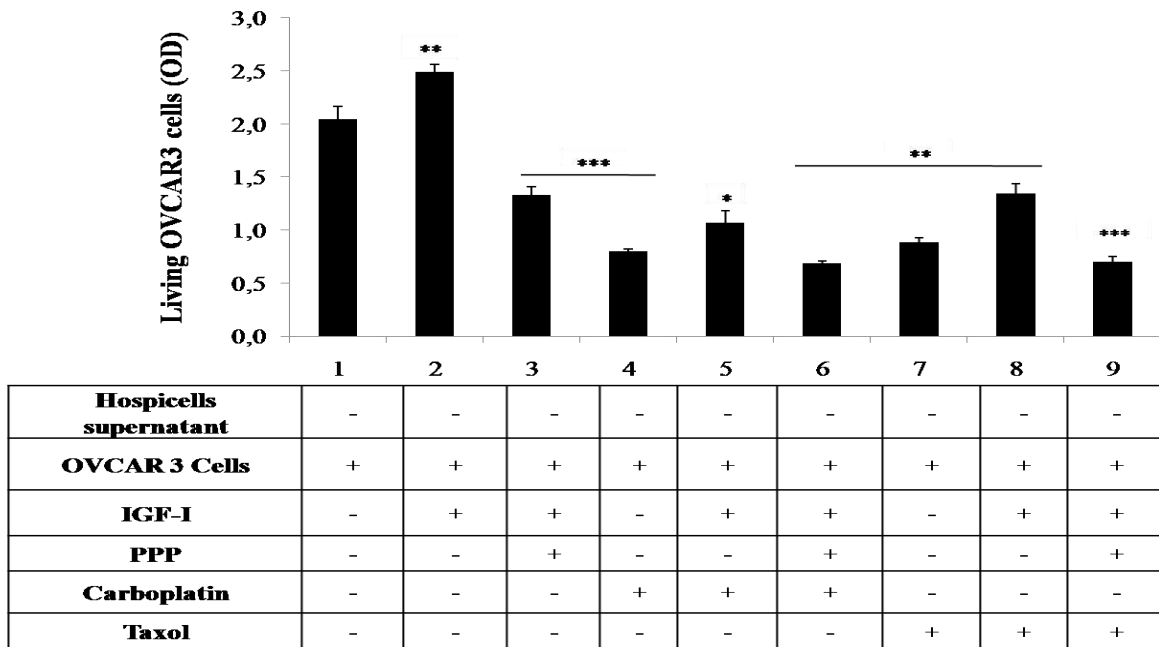


B

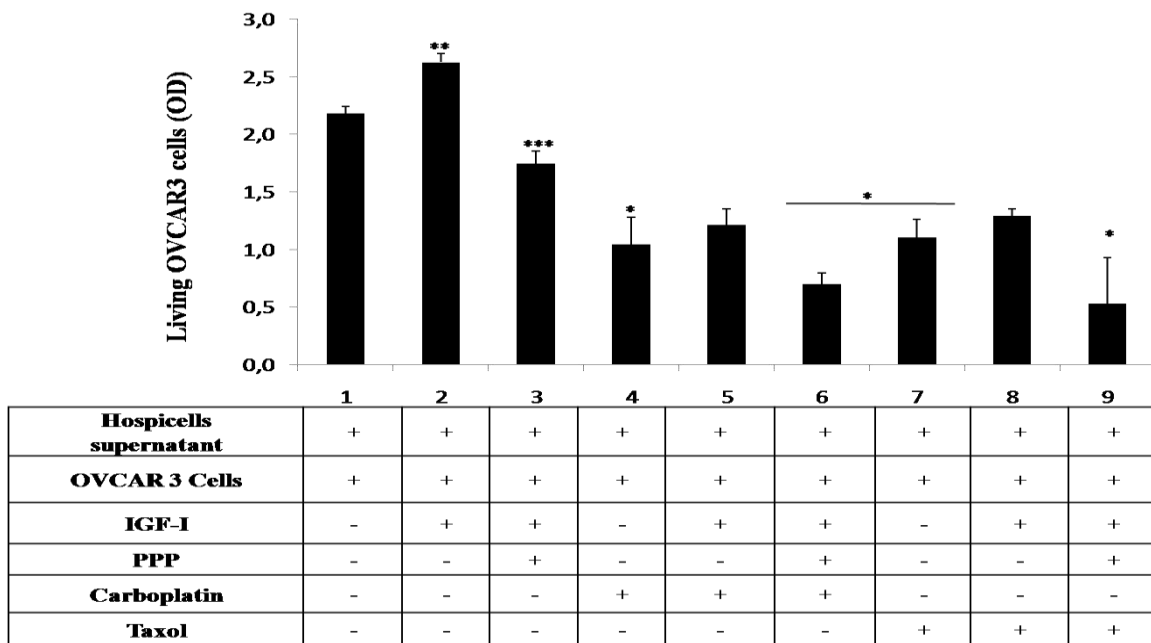
Inhibitors used	ABC genes expression
rottlerin (PKC inhibitor),	-
wortmannin (PI3 kinase inhibitor)	<i>BCRP</i> and <i>MRP2</i>
PD98059 (MEK inhibitor),	<i>MDR1</i> , <i>MRP1</i> and <i>MRP2</i>
Jak2 inhibitor	<i>MDR1</i> and <i>MRP2</i>
STAT3 inhibitor	<i>MDR1</i> and <i>MRP1</i>

**Figure 4:** A-Inhibition of ABC gene expression by inhibitors of signaling pathways. OVCAR3 cells were treated with IGF-I or not (control) for 12 hours in a culture medium without FBS and under the same conditions as the previous experiment. Then inhibitors rottlerin, wortmannin, PD98059, JAK2 inhibitor and STAT3 inhibitor were added to cell medium. The results were normalised with the mRNA expression of  *$\beta$ 2-microglobuline* and intensity of PCR bands of each experiment was measured using ImageJ software. B- Corresponding inhibitors for ABC genes expression in ovarian cell line treated by IGF-1.

**A**

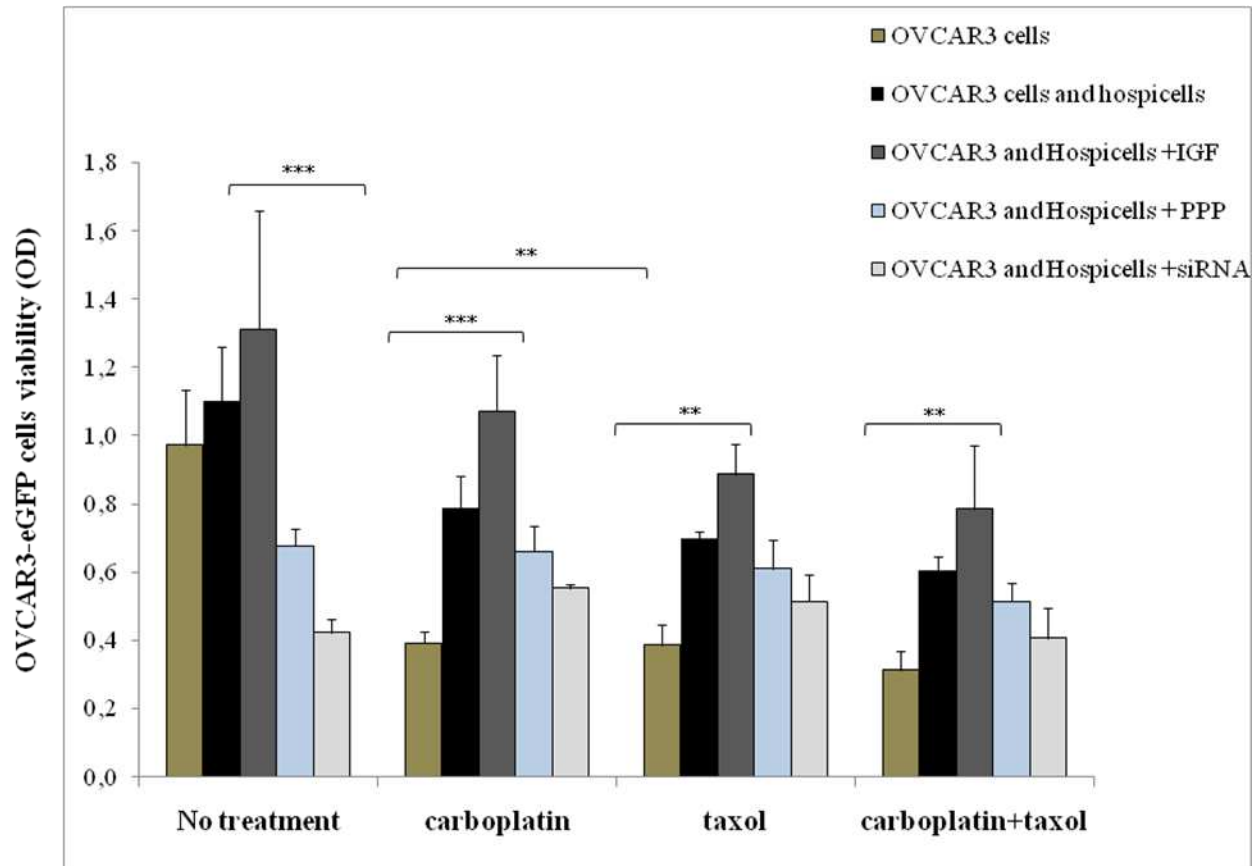


**B**



**Figure 5. A- Effect of IGF-I on drug resistance of OVCAR3 cells analysed by MTT. A.** OVCAR3 cells were incubated in the presence of IGF-I (200µg/ml) or PPP (1µM) in culture medium without FBS. After 24 hours of incubation, chemotherapeutic agents, carboplatin (22.2

$\mu\text{M}$ ) and taxol ( $1.4\mu\text{M}$ ) were added to the incubation media of OVCAR3 cells. The number of living OVCAR3 cells was evaluated by optical density using the MTT technique (B). OVCAR3 cells were incubated in the same conditions as the previous experiment in the presence of the Hospicells supernatants. Statistical evaluation was then give a mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ), and expression difference was found to be significant (\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.005$ ) compared to untreated control cells.



**Figure 6.** The hospicells in the presence of IGF-I showing increased drug resistance of OVCAR-GFP cells. In control, co-culture of Hospicells-OVCAR3 cells increased slightly the proliferation of OVCAR3 cells however; ppp and IGF-1R siRNA treatment abolished this effect. Hospicells protect the OVCAR3 cells against carboplatin, taxol and both drugs together. This protection increased slightly by exogenesis addition of IGF-1 and was abolished by PPP treatment. Addition of IGF-1R si RNA inhibited the cell proliferation under all condition independently of treatments. Mean  $\pm$  SE ( $n = 3$ ), the expression difference was significant (\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.005$ )

## **Article 2. Cet article sera soumis dans le journal de Leukemia**

### **A bone marrow stromal cell, Hospicell, regulate ATP-binding cassette genes expression *via* Insulin-like Growth Factor-I in leukemic cell line (HL60)**

Benabbou N., Mirshahi P., Bordu C., Faussat A.M., Tang R., Marie, J.P., Mirshahi M

Dans ce travail, nous avons étudié le rôle de IGF-I sécrété par le microenvironnement sur la chimiorésistance induite par l'interaction entre les cellules leucémiques myéloïdes sensibles ou résistantes et les hospicells isolées à partir des moelles. Nous avons montré que cellules leucémiques sensibles et résistantes expriment IGF-I ainsi que son récepteur IGF-IR, mais que IGF-I est davantage sécrété dans les cellules résistantes. Nous avons également montré que ces cellules leucémiques prolifèrent de façon plus importante que les cellules sensibles. En présence de IGF-I, cette prolifération est accrue alors qu'elle diminue en présence de l'inhibiteur de IGF-IR.

Nous avons également montré que le facteur de croissance IGF-I, sécrété par les hospicells des moelles, est impliqué dans la régulation du gène *MDR1*, *MRP1*, *MRP2*, *MRP3* et *BCRP*. L'expression de ces gènes ABC est augmentée lorsque le nombre d'hospicells augmente et diminue lorsqu'IGF-IR est inhibé.

Une co-culture entre les cellules leucémiques sensibles et les hospicells de moelle induit une protection de ces cellules leucémiques contre la chimiothérapie daunorubicine. Cette chimiorésistance est amplifiée par IGF-I et diminuée lorsque son récepteur IGF-IR est inhibé. La même expérience, réalisée avec les cellules résistantes, montre la chimiorésistance augmente davantage avec IGF-I. En revanche, en présence de l'inhibiteur de IGF-IR, nous observons une diminution de la chimiorésistance de ces cellules face au daunorubicine.

Ces résultats suggèrent que les hospicells protègent les cellules leucémiques sensibles contre la chimiothérapie. Cette chimiorésistance est augmentée dans les cellules résistantes exprimant la protéine P-gp et en présence de IGF-I, sécrété par le microenvironnement. L'inhibition de IGF-IR augmente la sensibilité des cellules résistantes à la chimiothérapie daunorubicine.

# **A bone marrow stromal cell, Hospicell, regulate ATP-binding cassette genes expression *via* Insulin-like Growth Factor-I in leukemic cell line (HL60)**

Nadia Benabbou, Pezhman Mirshahi, Camille Bordu, Anne-Marie Faussat, Ruoping Tang, Jean-Pierre Marie, Amu Therwat, Massoud Mirshahi\*

National Institut for Medical Research (INSERM), Cordeliers Research Center (UMRS 872),  
University of Pierre and Marie Curie, and University of Paris Descartes.

**Running Title:** Hospicells promote up regulation of ABC genes by IGF-1in leukemic cell line

**Key words:** IGF Signaling pathway, ATP Binding Cassette, Hospicells, chemoresistance, Leukemia,

\*Corresponding Author:  
M. Mirshahi, M. D., Ph. D. INSERM UMRS 872,  
Université Pierre et Marie Curie, Paris-VI,  
Université Paris Descartes, Paris-V,  
15 Rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France.  
TEL (33) 1 42 34 69 31  
FAX (33) 1 43 25 63 44;  
E-mail: [massoud.mirshahi@upmc.fr](mailto:massoud.mirshahi@upmc.fr)

## Abstract

The importance of the insulin-like growth factor, IGF (originally referred to as sulfation factor or somatomedin) as a signaling axis for cancer development, progression, and metastasis is highlighted by its effect on proliferation and acquired resistance in cancer cells.

However, the role of the microenvironment within which the cancer cells involve and which mediates this effect is far from well understood.

Thus this study was designed to demonstrate the involvement of IGF-I in induction of multidrug resistance in myeloid leukemic cells line in the presence of stromal cells.

We show that 1) drug sensitive and resistant leukemic cells express IGF-I and its receptor IGF-IR, but the resistant cells secrete elevated levels of IGF-I and 2) Show higher proliferation than the sensitive cells. The proliferation is increased by the presence of IGF-I whereas it decreases when in the inhibitor of IGF-IR is present. 3) The Hospicells of stromal origine and IGF-I, both are implicated in the regulation of resistance related genes ABC (*MDR1*, *MRP1*, *MRP2*, *MRP3* and *BCRP*). 4) The level of ABC gene expression by leukemic cells increases when the number hospicells present is high whereas it decreases when IGF-IR was inhibited. 5) Co-culture of the sensitive leukemic cells together with hospicells induces a protection of leukemic cells against daunorubicin. 6) This chemoresistance is amplified by IGF-I and is decreased when IGF-IR pathway is inhibited. Our results suggest the role of microenvironment and the IGF-I pathway in drug resistance by leukemic cells. This may open a new axis in cancer therapeutic approach.



## Introduction:

The major problem in treatments of leukemia is the appearance of multi-resistance of the tumor cells to the chemotherapeutic agents (Baudard *et al*, 1999). Several clinical trials were undertaken to study the multi-resistance response of the cancer cells. This chemoresistance is mediated by the expulsion activity of the ABC pumps. The expulsion activity of ABC pumps is at the origine of relapses in majority of the cases.

Chemoresistance of leukemic cells is primarily controlled by ABCB1 gene (MDR1) coding for P-gp protein. In addition to this, the microenvironment of the cancer cell plays an important role in drug resistance. However, the precise nature of molecular interactions between the stromal and leukemic cells remains still elusive. A distinct population of stromal cells that form the tumor microenvironment in bone marrow was identified and isolated in our laboratory and called for the first time “Hospicells”. These hospicells have been shown to confer drug resistance to cancer cells during chemotherapy (Rafii *et al.*, 2008).

The effect of Insulin like Growth Factors (IGFs) in cancer cell proliferation and metastasis has been the focus of recent research (Wu *et al.*, 2003). Several studies have shown that high levels of plasma IGF-1 increases the risk of breast, prostate, colon and lung cancers (Yang and Winslet, 2011). It becomes obvious that IGF-I has a role in cell proliferation (Samani *et al.*, 2006) and apparently inhibition of cell death (Heron-Milhavet and LeRoith, 2002).

In fact, IGF-I found to be important in maintaining growth and survival of cancer cells in hematological malignances (He *et al.*, 2010). Increased expression of IGF-I is associated with Ara-C resistance in human myeloid leukemia cells (Abe *et al* 2006). The IGF-I/IGF-IR axis contribute also to acquired bortezomib (an anti proteasome agent) resistance in myeloma cells (Kuhn *et al*, 2012). Moreover, IGF-I promotes multidrug resistance in colon cancer cells (Guo *et al*, 1998), and in T-lymphoblastoid cell line (Schwartz *et al.*, 1999). In acute myeloid leukemia (AML), the two ligands IGF-I and IGF-2 are known to stimulate proliferation of leukemic blasts (Shimon and Shpilberg, 1995). Furthermore, autocrine expression of IGF-I has been detected in AML (Doepfner *et al.*, 2007) and inhibition of IGF activity resulted anti proliferative effects on leukemic cells (Doepfner *et al.*, 2007; Baier *et al.*, 1992). Recently, in stromal cells derived from AML bone

marrow, we reported about the involvement of IGF-I in the vasculogenic mimicry (Mirshahi *et al*, 2009).

It is therefore obvious that IGF-I is related to many of the proliferative functions of the cancer cells.

In this study, the effect of IGF-I on the regulation of the ABC genes (*MDR1*, *MRP1*, *MRP2*, *MRP3*, *MRP5* and *BCRP*) in leukemic cells is reported. We also seek to elucidate the possible involvement of this ligand in the alteration of drug resistance to daunorubicin in human myeloid leukemia cell lines that were co-cultured with hospicells.

## **Material and Methods**

### **8. Cell Culture**

#### *cell lines*

Four cell lines were used in this study, K562 and HL60 derived from human myeloid leukemia and their derivatives K562/Dox and HL60/DNR (gifted by R. Tang, Hôpital Hotel Dieu, Paris, France, respectively), which were developed respectively as daunorubicin and Doxorubicin resistant lines. All the cell lines were maintained in culture using RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum (FBS), 1% L-glutamine 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin and incubated at 37 °C in an atmosphere humidified with 5% CO<sub>2</sub>.

#### *Hospicells isolated from bone marrow*

The hospicells were isolated from three AML-derived bone marrow (Hôpital Hotel Dieu, Paris, France). The step of isolation of bone marrow-adherent mononuclear cells was carried out by Ficoll density gradient centrifugation as described by Gilmore *et al.*, The Monocytes present in the mononuclear cells were excluded by adhesion on plastic Petri plates for 30 min. Then, the non adherent cells were collected and used to isolate CD34 + or CD133 + cell population (immunomagnetic beads with; MACS, Miltenyi Biotec, Paris, France) according to the manufacturer's instructions. Then, the CD34+ or CD133+ cells were cultured for 3 weeks in wells coated with 0.2% gelatin in endothelial cell basal medium MV2 (Promocell, Heidelberg, Germany)

supplemented with 1 g/ml ascorbic acid, 10 ng/ml b-FGF, 5 ng/ml EGF, 20 ng/ml insulin growth factor-1 (IGF-1), 0.5 ng/ml VEGF and 15% FCS (all the supplements are expressed at final concentrations). After 15 days of culture at 37 °C in a humidified atmosphere and 5% CO<sub>2</sub>, non adherent cells were removed. The adherent cells were detached with accutase, counted and then cultured in a 24-well plate at 10<sup>5</sup> cells / ml of medium MV2.

After cultivation, CD34 + or CD133 + cells differentiated into endothelial cells, muscle cells, fibroblast and hospicells newly identified by our laboratory. This one showed that the HL60 cells were able to fix hospicells specifically forming the rosettes. This feature has also been exploited for hospicells separation from other adherent cells. Indeed, the rosettes are formed after 2 h incubation hospicells with HL60 cells at 37°C, and no adherent cells are removed. After washing with RPMI medium without serum, cells were incubated in 1 ml of MV2 medium for 18 h at 37°C. After removing the supernatant, the cells were detached with accutase and aggregates "hospicells-HL60" were separated from other cells by centrifugation. Aggregates were then re-cultured in a MV2 medium supplemented with FBS 10%.

Elimination of HL60 cells was necessary for the continuity of experiences. The culture medium was discarded; 1 ml of 1% EDTA was added to each well after washing the cells. After vigorous stirring for 10 min, HL60 cells were detached from hospicells and are found in the supernatant that was eliminated. The hospicells were then cultured in the medium MV2 complete.

## **9. Treatment of cells with IGF-I and IGF-IR inhibitor**

The leukemic cell lines were incubated with IGF-I (200 ng/ml) and IGF-IR inhibitor (picropodophyllin, 1 µM) from Calbiochem (Paris, France).

## **3. Reverse transcription and polymerase chain reaction (RT-PCR)**

Total RNA was extracted with the Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel EURL, Hoerd, France). Reverse transcription was performed using M-MLV reverse transcriptase and oligo (dT) primers (Gibco, Paisley, UK). The polymerase chain reaction (PCR) was performed by *Taq* DNA polymerase (Gibco-BRL, Paisley, UK). Specific primers for *IGF-I*, (sense : 5'-AAA TCA GCA G TC TTC CAA C-3', antisense : 5'-CTT CTG GGT CTT GGG CAT GT-3'; *IGF-II* (sense : 5'-AGT CGA TGC TGG CTT CTC A-3', antisense : 5'-GTG GGC GGG GTCT TGG GTG GGT

AG-3'); *IGF-IR* (sense : 5'-GAC ATC CGC AAC GAC TAT CAG-3', antisense : 5'-GTA GTT ATT GGA CAC CGC ATC-3'); *IGF-IIR* (sense : 5'-TAC AAC TTC CGG TGG TAC ACC A-3', antisense : 5'-CAT GGC ATA CCA GTT TCC TCC A-3'); *MDR1*(5'-GTT ATA GGA AGT TTG AGT TT-3' and antisense : 5'-AAA AAC TAT CCC ATA ATA AC-3'); *MRP* (5'-AAT GCG CCA AGA CTA GGA AG -3' and antisense 5'-ACG GGA GGA TGT TGA ACA AG-3'); *MRP2* (sense : 5'- CTG GTT GAT GAA GGC TCT GA-3',antisense : 5'-CTG CCA TAA TGT CCA GGT TC-3'); *MRP3* (sense : 5'-GCA GGT GAC ATT TGC TCT GA-3' antisense : 5'- CCC TCT GAG CAC TGG AAG TC-3'); *MRP5* (sense : 5'-GGA TAA CTT CTC AGT GGG- 3', antisense : 5'-GGA ATG GCA ATG CTC TAA AG-3') ; *BCRP* (sense : 5'-TTA GGA TTG AAG CCA AAG G-3', antisense : 5'-TAG GCA ATT GTG AGG AAA ATA-3') and  *$\beta$ 2-microglubulin* (sense : 5'-CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC-3', antisense : 5'-GAT GCT GCT TAC ATG TCT CG-3'). The PCR products, along with a 100-bp DNA ladder, were analysed by electrophoresis on agarose gels containing ethidium bromide.

## 1. IGF Protein expression by leukemic cells

The presence of proteins belonging to IGF family in cell lines was revealed by immunocytochemistry. The leukemic cell lines were seeded and fixed at 20,000 cells / well in glass bottom chamber slides (Lab-Tek, Nunc, Naperville, USA). The cells were then permeabilized and incubated for 2 h at room temperature with either specific primary antibodies (dilution 1/200) anti-IGF-I, -II, -IR or -IIR (R & D Systems, Minneapolis, USA). After several washes, cells were incubated successively with biotinylated secondary antibody and streptavidine coupled to fluorescein isothiocyanate (dilution 1/500), for 45 min. Isotypic controls were performed concurrently and nuclei were DAPI-labeled. The cells were then visualized by fluorescence microscopy.

## 2. P-gp, expression analysis

P-gp, was studied by using UIC2 (Immunotech, France), monoclonal antibody, then labeled with a secondary antibody conjugated with phycoerythrin. Cells ( $1 \times 10^6$ ) were fixed and permeabilized using IntraPrep™ (Beckman Coulter, Villepinte, France) according to the instructions of the manufacturer. The fluorescence was measured and analyzed by flow cytometry. Protein expression

for each transporter was quantified as the mean fluorescence intensity (MFI) shift (ratio of the MFI of antibody and isotype control). All experiments were performed in triplicate.

### **3. Studies of drug resistance of HL60 and HL60/DNR cells in the presence of Hospicells**

The hospicells were seeded first at 60% confluency in a 96-well flat-bottomed cells-culture plate in the presence of complete medium containing 10% FBS. After 18 hours incubation, the leukemic cells (10 000 cells / well) were added and co-cultured for 24 h with hospicells in the presence of IGF-I (200 µg/ml) or IGF-IR inhibitors : (PPP 1µM) before addition of daunorubicin. The effect of these cytotoxic agents was evaluated quantitatively by determining the optic density (OD) in the multi-well plate reader (Wallac, PerkinElmer, Waltham, USA). The result is representative of three independent experiments.

### **7. Statistical analyses**

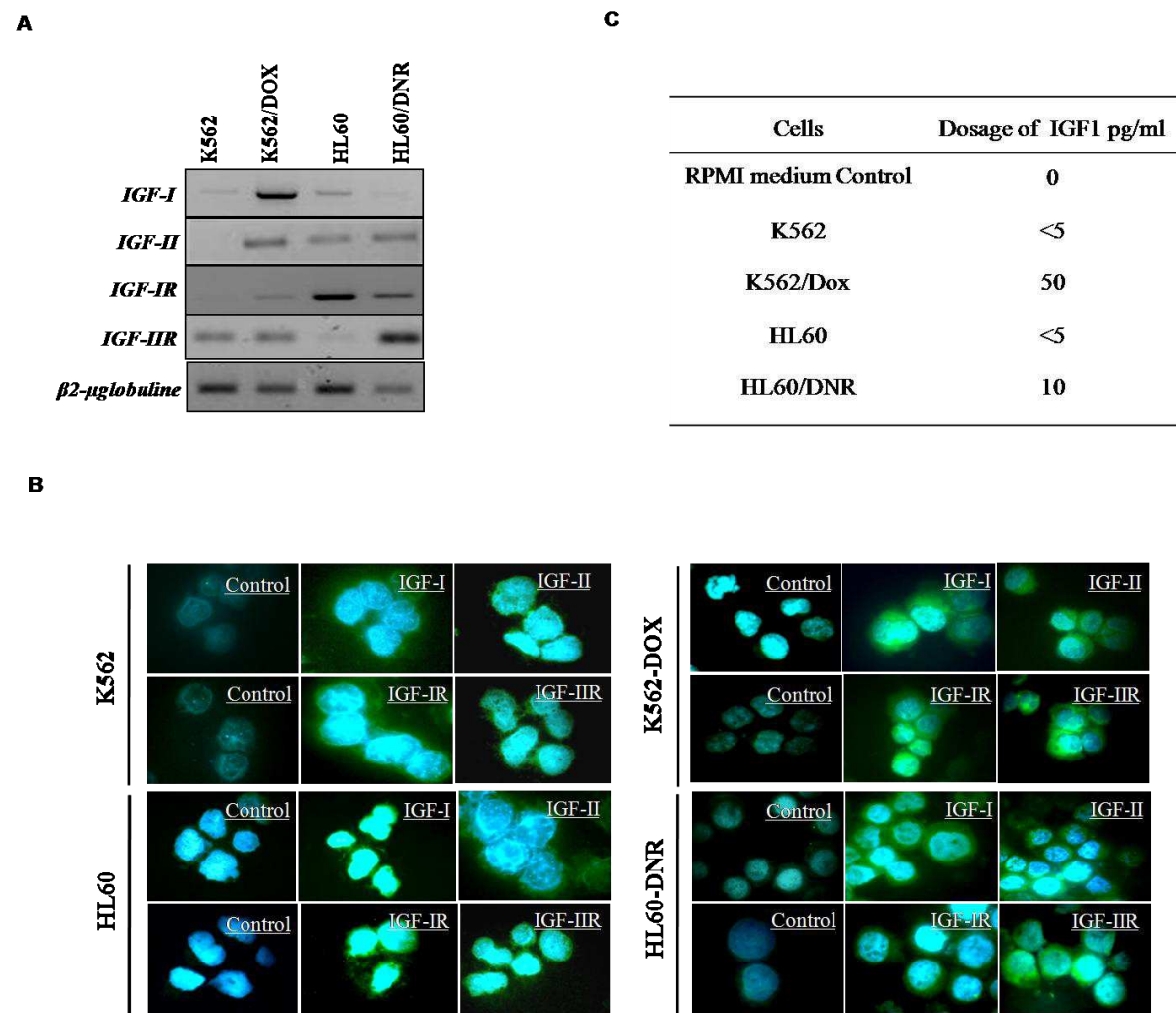
The results are presented as mean  $\pm$  SE and data was analyzed using student test P value <0.05 was considered significant.

## **Results:**

### **1. Expression of IGFs and IGF-R by the leukemic lines**

The analysis of the expression of IGF-I, IGF-II, IGF-IR and IGF-IIR was carried out on the level transcriptionnel and traductionnel in 4 leukemic cellular lines. Two first, K562 and HL60, are cells sensitive to chemotherapy. The two following ones, k562/Dox and HL60/DNR, are cells resistant to the doxorubicin and the daunorubicin respectively. The figure 1-A show a difference in expression of IGFs and their receptors in the 4 leukemic lines. These results were confirmed at the protein level by immunocytochemistry (Figure 1-B). We also quantified the secretion of IGF-I in

pg/ml in the supernatants of the sensitive and resistant leukemic cells (Figure 1-C). The results show that the resistant cells secrete IGF-I in quantity greater than the sensitive cells, more particularly, the K562/Dox cells which express and secrete strongly IGF-I (50 pg/ml).

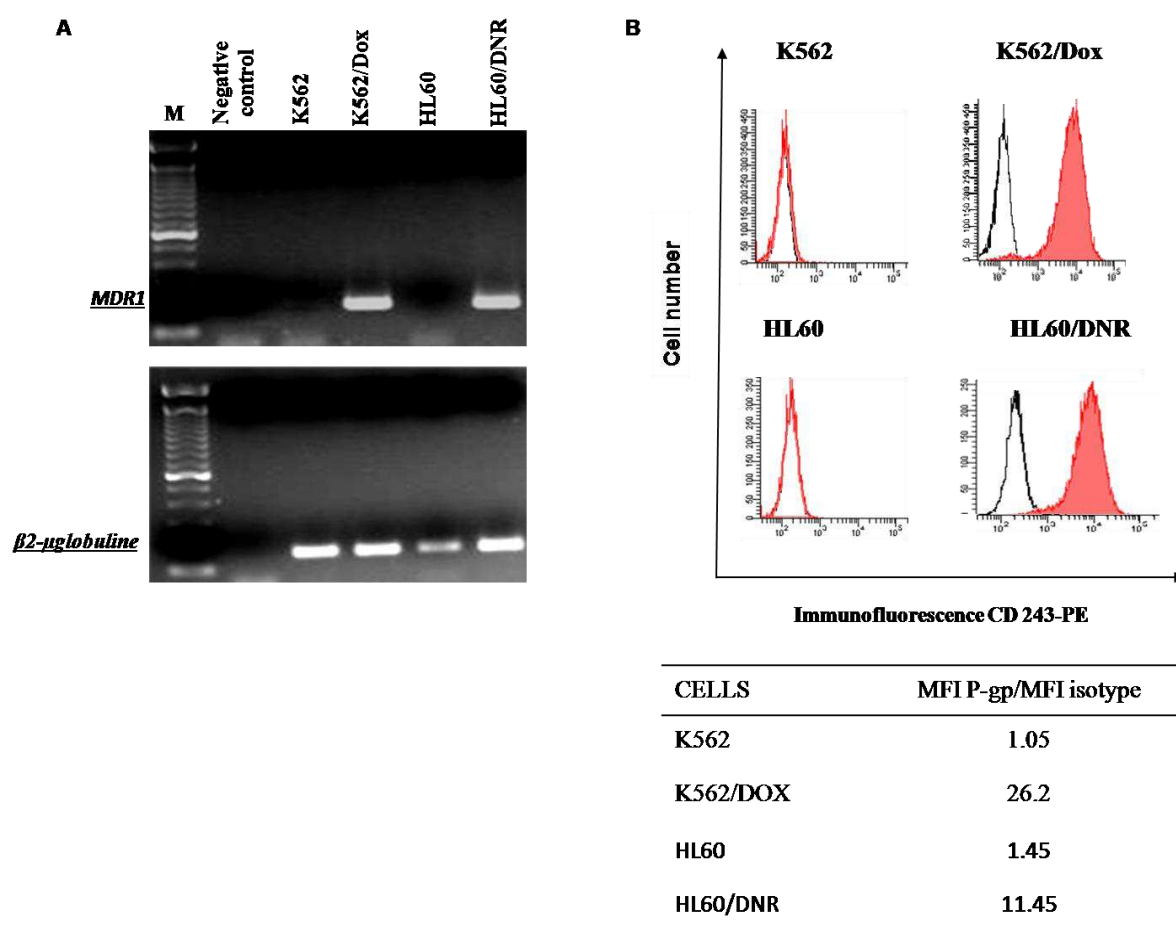


**Figure 1: Expression of IGFs and IGF-R by the leukemic lines.**

A. The total ARN of the cells were extracted and transcribed in ADNc. The expression of genes *IGF-I*, - *II*, - *IR* and - *IIR* was studied by RT-PCR by using specific primers. The results were standardized with the expression of mRNA of the  $\beta_2$ -microglobuline. B. The proteins of IGF family were analyzed by immunocytochemistry using specific antibodies of each member of IGF family. As negative controls, the cells were incubated only with the secondary antibodies: anti-mouse for ligands and anti-goat antibodies for receptors.

## 2- Expression of permeability-related glycoprotein (P-gp) by the sensitive and resistant leukemic cells

For evaluate the expression of the P-gp in the sensitive and resistant leukemic cells. The *MDR1* gene coding for protein P-gp was studied by the RT-PCR. The figure 2-A shows that *MDR1* mRNA is strongly expressed by resistant cells K562/Dox and HL60/DNR whereas sensitive cells K562 and HL60 do not express it. These results were confirmed in flow cytometry by the analysis of protein P-gp (Figure 2-B). The values of MFI (Mean Fluorescence Intensity) P-gp/ MFI control were presented in the table.



**Figure 2: Expression of P-gp by the leukemic cells.**

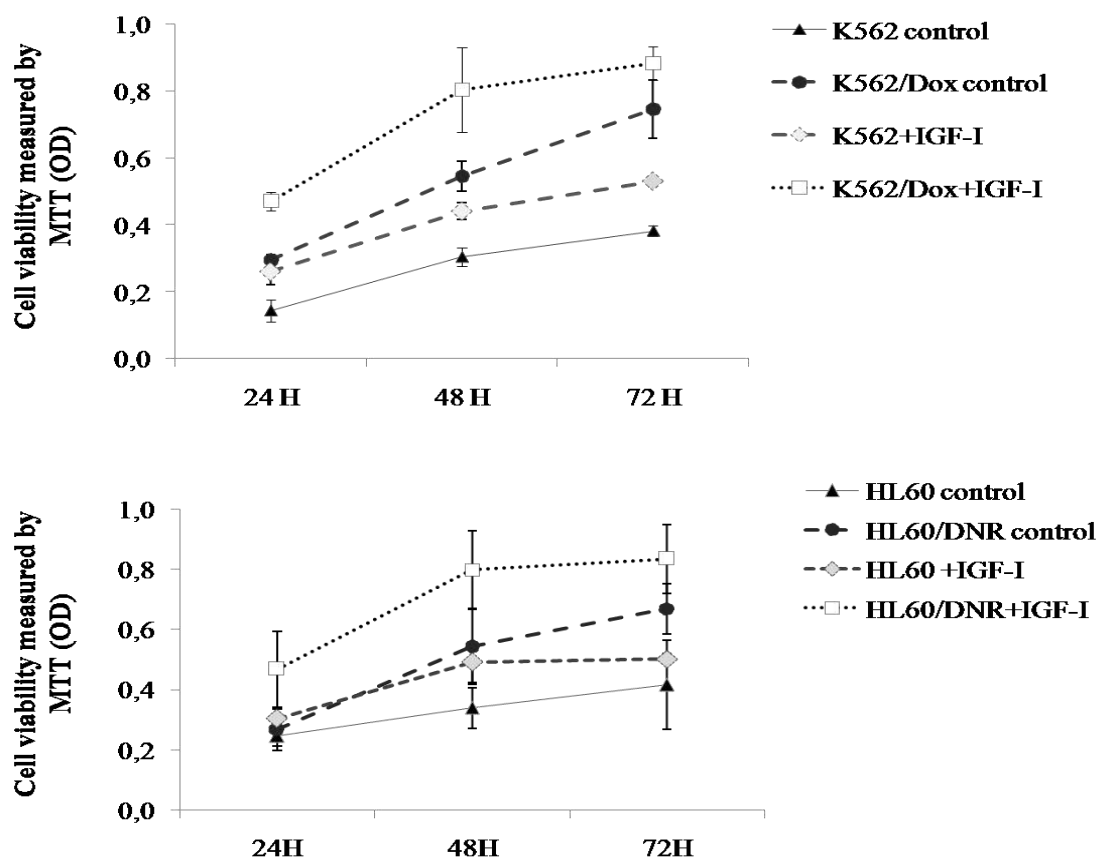
**A.** The expression of *MDR1* mRNA was studied in K562, K562/Dox, HL60 and HL60/DNR cells by RT-PCR and  $\beta 2$ -microglobuline used as control. A negative control was carried out containing

water in the place of ADNc. **B.** flow cytometry analysis of P-gp using anti CD243-phycoerythrin. P-gp expression was quantified as the mean fluorescence intensity (MFI) shift (ratio of the MFI of P-gp and isotype control)

### **3- The effect of IGF-I on the proliferation of the sensitive and resistant leukemic cell lines**

It is allowed that IGF-I plays a part in the growth and the proliferation of the tumoral cells. In this study, we determined the various effects of IGF-I on the proliferation of the sensitive and resistant cells. Figure 3 show that the resistant cells K562/Dox and HL60/DNR proliferate more than the sensitive cells K562 and HL60. Moreover, in the presence of IGF-I, the proliferation of the two resistant cell lines increases compared to that of the cells controls. An increase of sensitive cells proliferation is also observed in the presence of IGF-I compared to the sensitive cells controls. These results show that IGF-I activates the proliferation of these cells, its effect being more important in the resistant cells than in the sensitive cells.





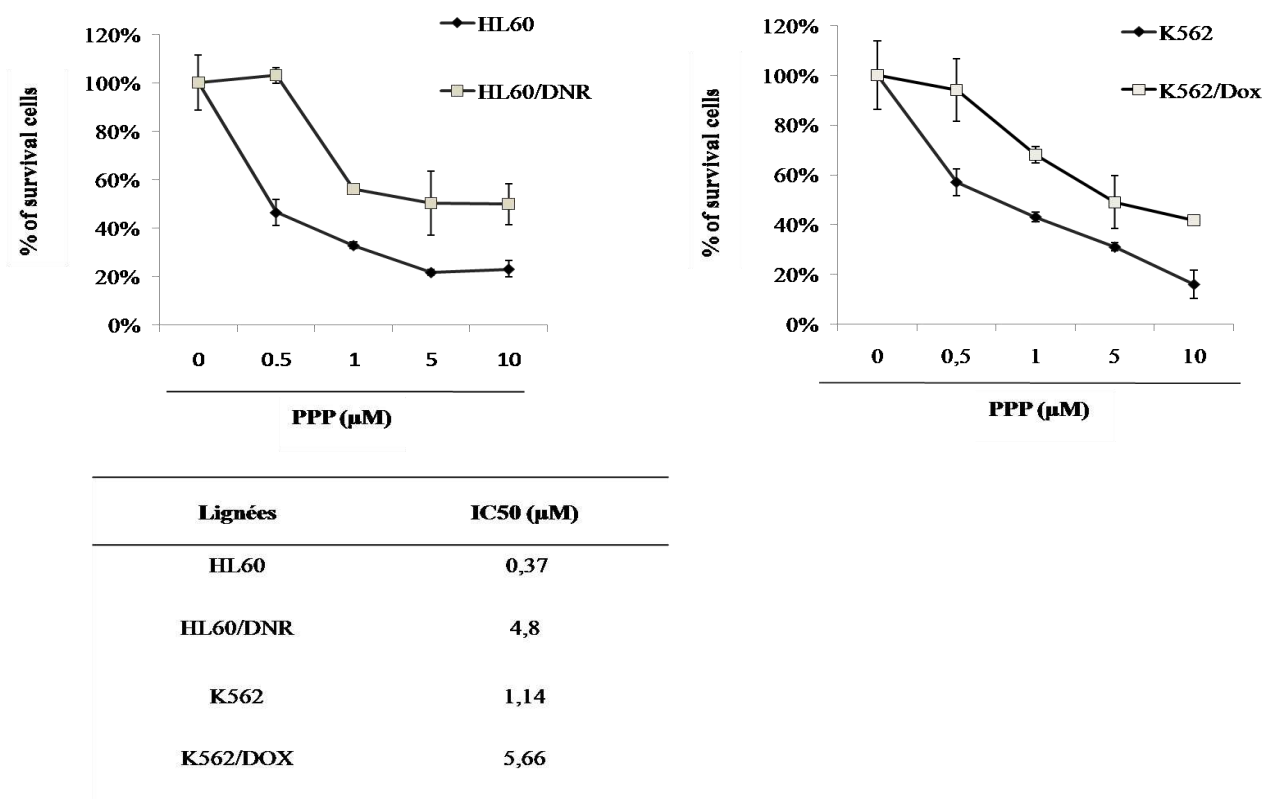
**Figure 3: Effect IGF-I on the proliferation of the sensitive and resistant leukemic cells.**

The cell lines were incubated in a culture medium without FBS (control) or in the presence of IGF-I (200 ng/ml of culture medium) during 24, 48 and 72 h at 37°C. The cell proliferations were studied by the method of MTT by analyzing the optical density under each condition of experiment.

#### **4- Evaluation of the cytotoxicity of the inhibitor of IGF-IR, picropodophyllin (PPP):**

The picropodophyllin (PPP) is a cyclolignan that suppresses IGF-IR activity and downstream pathways. The inhibitor PPP may exert pro-apoptotic effects through pathway no dependent on IGF-IR (Girnita *et al*, 2004) and can decreased phosphorylated Akt (Kuhn *et al.*, 2012). In this study, we determined the effect of PPP, IGF-IR inhibitor on the resistant and sensitive leukemic cells: HL60/DNR, K562/Dox witch expressed P-gp protein and the K562, HL60 cells which do not express it, (Figure 4). The values of the IC<sub>50</sub> of PPP in these cell lines were evaluated by MTT

tests. The table of figure 4 show that the values of the IC<sub>50</sub> of PPP are higher in resistant leukemic cells K562/Dox and HL60/DNR than in those of the sensitive cells.

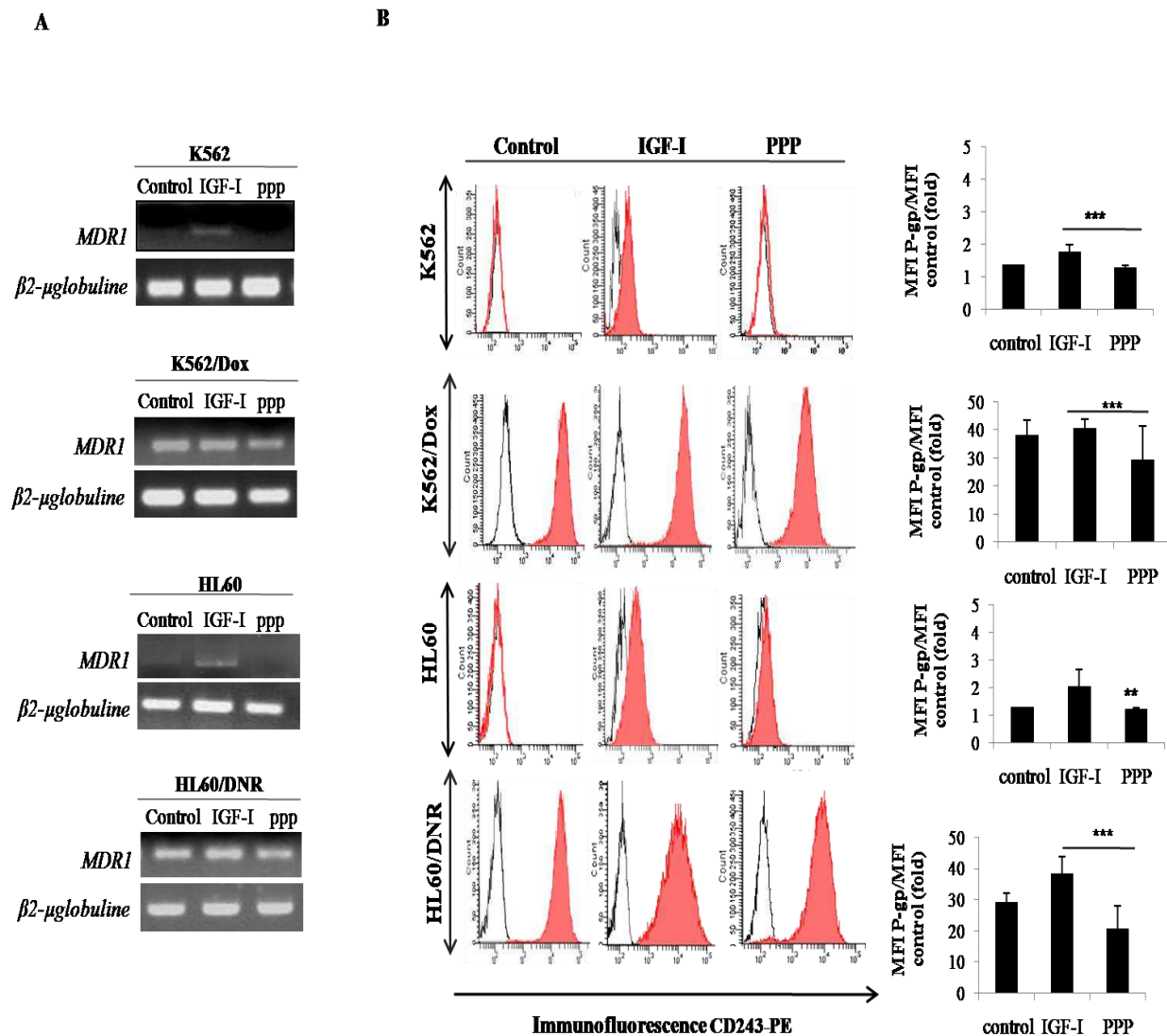


**Figure 4: Effects of the inhibitor of IGF-IR (PPP) on the proliferation of the leukemic cells.** The sensitive and resistant leukemic cells were incubated in the presence of inhibitor PPP with various concentrations (0; 0.5; 1; 5 and 10 μM) in a medium RPMI without FBS during 24h at 37°C. The effect PPP on the proliferation of the cells was evaluated by MTT test.

#### **5- Regulation of the expression of *MDR1* mRNA and its protein P-gp in the sensitive and resistant leukemic cells by IGF-I.**

After observation of effect of IGF-I in sensitive and resistant leukemic cell lines proliferation, we studied the effect of the IGF-I on *MDR1* gene and P-gp. The expression of *MDR1* was analyzed by RT-PCR (Figure 5-A) whereas protein P-gp (Figure 5-B) was studied by flow cytometry. We also examined the possibility that IGF-I induces the expression of *MDR1* mRNA and P-gp in sensitive cells K562 and HL60. The results obtained show an induction of expression of *MDR1* mRNA and

its protein P-gp in these cells treated by IGF-1 (Figure 4-A). This expression of P-gp induced by IGF-I is inhibited in the presence of IGF-IR inhibitor, PPP. In HL60/DNR cells, the expression of P-gp was increased in the presence of IGF-I, and it decreases with PPP inhibitor. On the other hand, in the resistant cells, K562/Dox treated by IGF-I, no significant difference in expression of *MDR1* and P-gp is observed as compared the controls cells. This result can be explained by the fact that the expression of P-gp is on its maximum level in these cells and more important of that of cells HL60/DNR. These two resistant cell lines, *MDR1* gene and P-gp protein decreased in the presence of PPP inhibitor. All these results suggest that IGF-I, via its IGF-IR, able to induce and control the expression of P-gp, the major pump implicated in the chemoresistance in the leukemic sensitive and resistant cell lines.



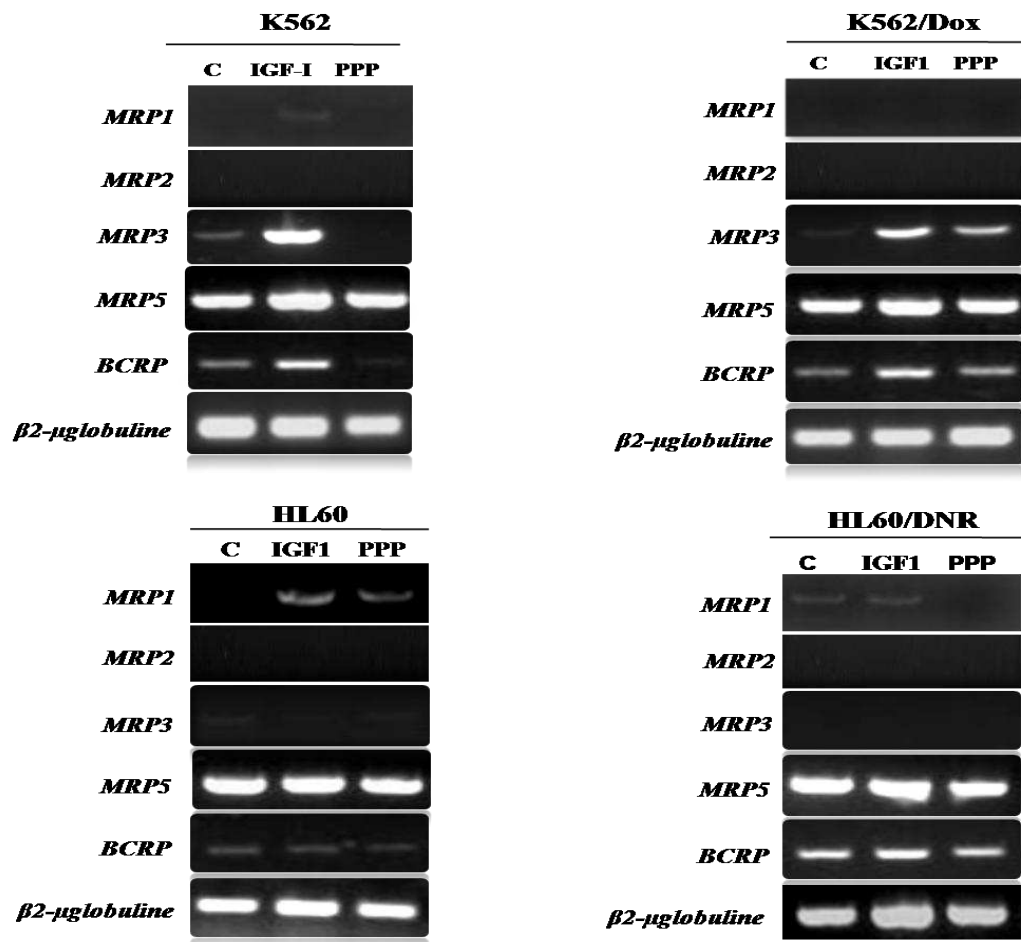
**Figure 5: IGF-I controls the expression of *MDR1* and P-gp in the leukemic cell lines.**

**A.** The leukemic cell lines were incubated in the presence of IGF-I or PPP during 12h. The expression of *MDR1* was analyzed by RT-PCR by using specific primers. **B.** The expression of P-gp protein was studied by cytometry in flow using an antibody anti P-gp coupled with phycoerythrine (anti CD243-PE). Isotypic IgG2a was used as negative control.

## 6- Regulation ABC genes by IGF-I

Given the effect IGF-I on the regulation of the *MDR1* expression in the leukemic cell lines, we analyzed the effect of IGF-I on the other ABC genes, among that having a crucial role in chemoresistance of the leukemic cells. Cell lines: K562, K562/Dox, HL60 and HL60/DNR were incubated in the presence of IGF-I or PPP, under the same conditions as the preceding experiment. Results obtained for the mRNA's the genes ABC: *MRP1*, *MRP2*, *MRP3*, *MRP5* and *BCRP* (breast cancer resistance protein) by using RT-PCR analysis. In the basal state, the expression of *MRP1*, *MRP2*, *MRP3* and *BCRP* are low or non-existent in the 4 leukemic cell lines, whereas the expression of *MRP5* is strong (Figure 6). In the K562 cells and its derivative, the K562/Dox cells, the expression of *MRP3* and *BCRP* increase significantly in the presence of IGF-I. On the other hand, the expressions of *MRP3* and *BCRP*, in these same cell lines, disappear or decrease respectively in the presence of PPP. We also note a slight induction of the expression of *MRP1* mRNA in the presence of IGF-I in K562 cells, and its inhibition with PPP. The induction of expression of *MRP1* gene is also observed in HL60 cells in the presence of IGF-I, and decreased with PPP.

In resistant cells, HL60/DNR, there was no significant difference in expression of *MRP1* mRNA in the presence of IGF-I, but the addition of PPP in the medium of incubation of the cells induces an inhibition of *MRP1* gene expression. No difference noted in expression for *BCRP* and *MRP2* mRNA's in the HL60 cells and its derivative HL60/DNR, incubated under various conditions. On the other hand, the expression of *MRP5* gene is not sensitive to the effect of IGF-I and that of PPP, and does not undergo any modification.



**Figure 6: Regulation of the ABC genes by IGF-I**

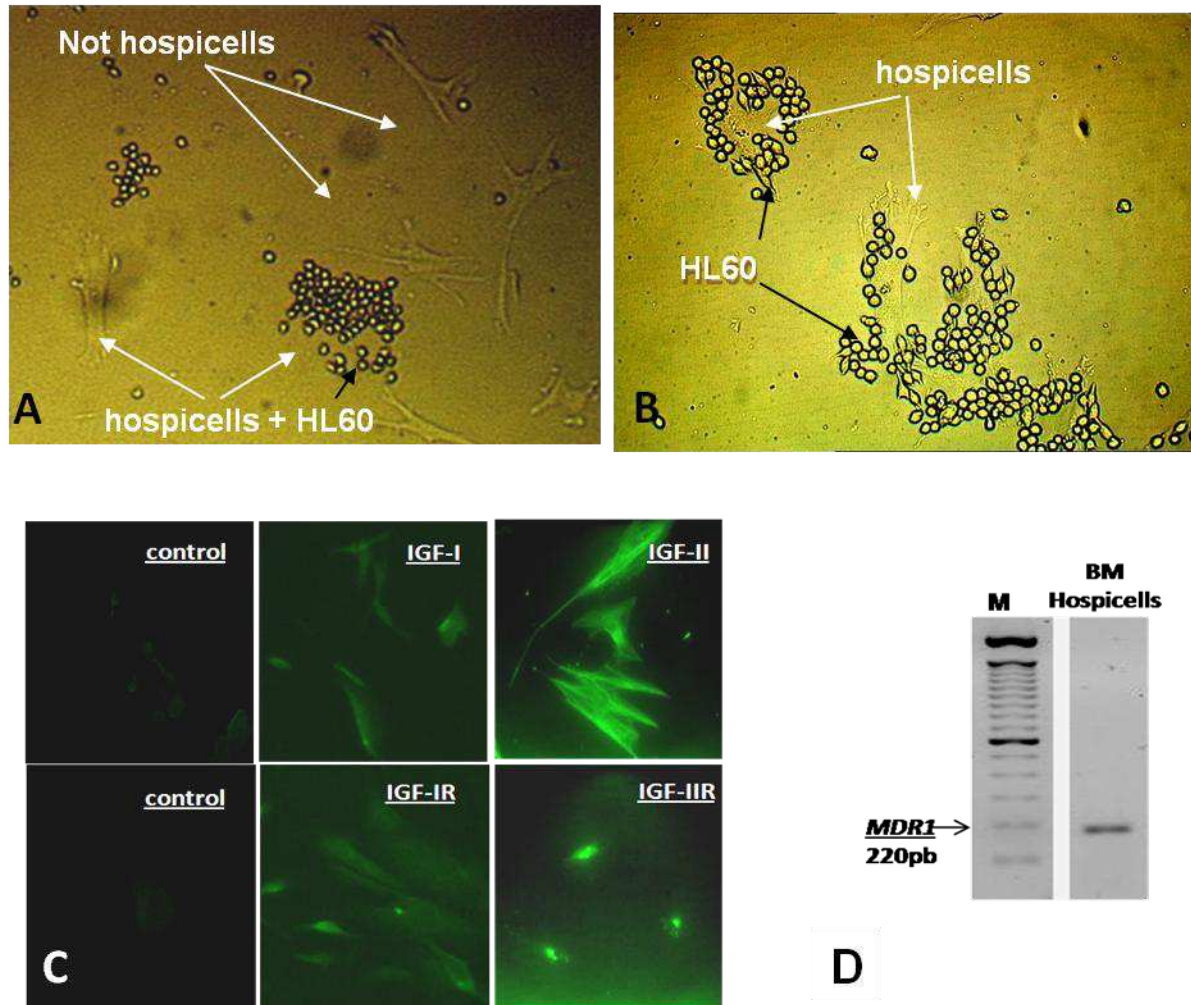
The four leukemic cell lines were incubated in the presence of IGF-I (200ng/ml) or PPP (0.5μM for the HL60 and K562; 1μM for K562/Dox and HL60/DNR) during 12h with 37°C. Then, a RT-PCR, using specific primers (see Material and Methods) was carried out to study the expression of mRNA for genes: *MRP1*, *MRP2*, *MRP3*, *MRP5* and *BCRP* with *β2-microglobuline* as a control. The cells were also incubated in a medium without FBS, to be used like a cells controls.

### **7- Expression of IGFs, IGF-R and *MDR1* by the hospicells isolated from AML bone marrow.**

The Hospicells were identified among other stromal cell because of their property to interact with HL60 cells (figure7-A). Figure 7-B show interaction of HL60 with purified hospicells. After having studied the effect exogenic IGF-I on the proliferation of the sensitive and resistant cell lines, and on the regulation of expression of the ABC genes, we wanted to analyze the

consequences of the induction of the P-gp expression on the chemoresistance of HL60 cells co-cultivated with hospicells.

For this purpose, we first studied expression of IGF family and *MDR1* in the hospicells isolated from AML (Acute Leukemia Myeloid) bone marrow according to the protocol describes in the Material and Methods. First of all, the expression of proteins IGF-I, IGF-II, IGF-IR and IGF-IIR was studied in the hospicells by immunocytochemistry and was revealed by fluorescence microscopy (figure 7C). The results show that the hospicells from AML bone marrow express all the components of family IGF: IGF-I and IGF-II and their receptors IGF-IR nad IGF-IIR. Moreover, one study of Mirshahi *et al*, (2009), realized in our laboratory, shows that the stromal cells derived from the AML bone marrow secrete strongly IGF-I ( $> 100\text{pg/ml}$  for  $1 \times 10^5$  of cells) compared to the stromal cells of normal bone marrow. Figure 7D present the *MDR1* gene expression in hospicells by RT-PCR.



**Figure 7. Expression of IGFs, IGF-R and *MDR1* in the hospicells from AML bone marrow.**

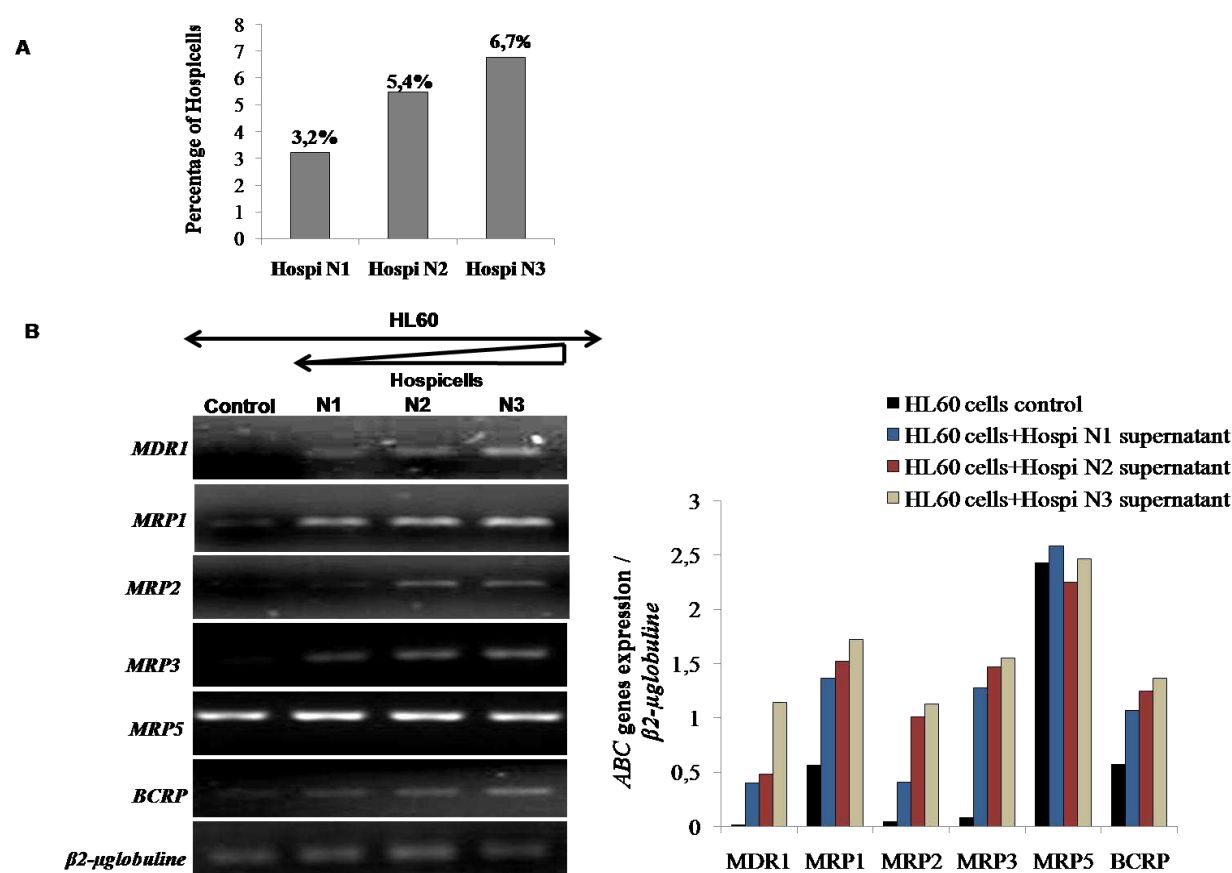
**A-** Hospicells were identified among other stromal cell because of their property to interact with HL60 cells. **B-** interaction of HL60 with purified hospicells , **C-** The hospicells were incubated in the presence of the antibodies IGF-I, - II, - IR and - IIR during 2h and then with secondary antibodies during 1 h. the results were revealed by using the streptavidine fluorescein in fluorescence microscopy. **D-** Expression of *MDR1* by the hospicells analyzed by RT-PCR.

### **8- Regulation of the ABC genes by interactions hospicells- HL60 cells**

After having isolated the hospicells from bone marrows of three patients with leukemia myeloide (LAM) according to the protocol describes in the Material and Methods. We counted then the number of hospicells, in each sample. The number of the hospicells differ from one patient to another (Figure 8-A). Then, we co-cultivated these cells with HL60 cells during 12h to study a



possible induction of ABC genes expression. The choice of HL60 cells was established compared to its capacity to fix the hospicells specifically by forming rosettes whereas the K562 cells adhere little on the hospicells. The figure 8-B shows that HL60 cells express mRNA for *MDR1*, *MRP2* and *MRP3* in the presence of the hospicells whereas they did not express them in a base line (control). Moreover, the expression of these genes increases with the number growing of the hospicells in the three samples. We also note an increase of the *MRP1* and *BCRP* expressions in correlation with the number growing of the hospicells. In contrast, no effect was observed on the expression of *MRP5* in the presence of the hospicells compared to control.

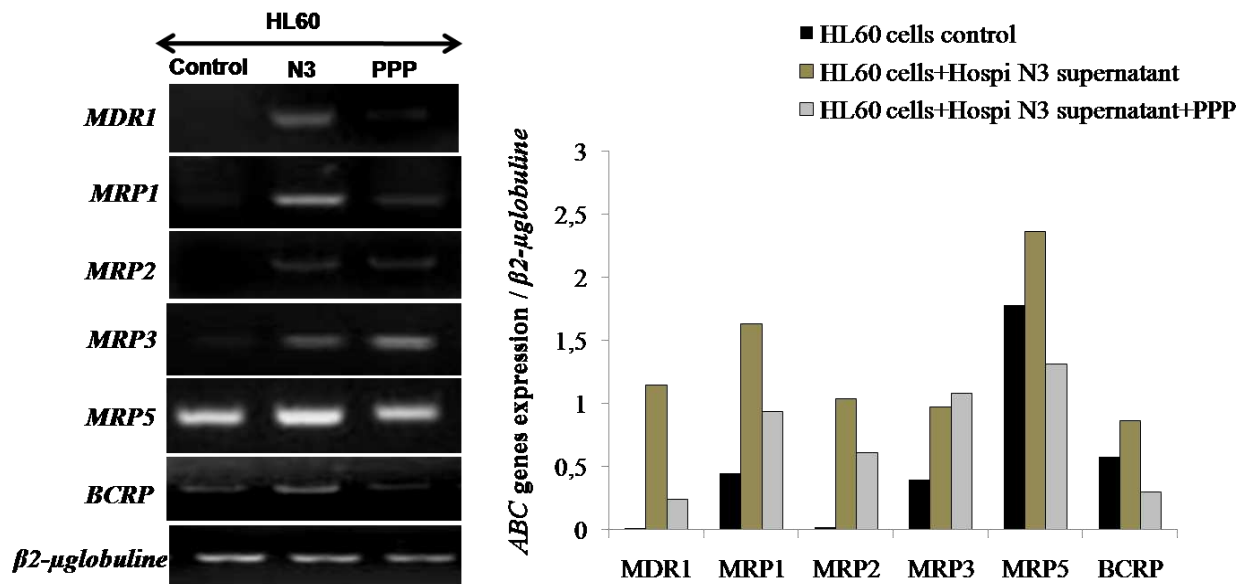


**Figure 8: Expression of the ABC genes by HL60 cells co-cultivated with the hospicells.**

**A.** The hospicells isolated from three bone marrows of LAM were counted and calculated expressed as a percentage compared to the total number of mesenchymal stromal cells. **B.** HL60 cells co-cultivated with the hospicells of three bone marrows during 12h. The results were analyzed by RT-PCR.

### 9- Effect of the inhibition of IGF-IR on the ABC genes expression in HL60 cells co-cultivated with hospicells.

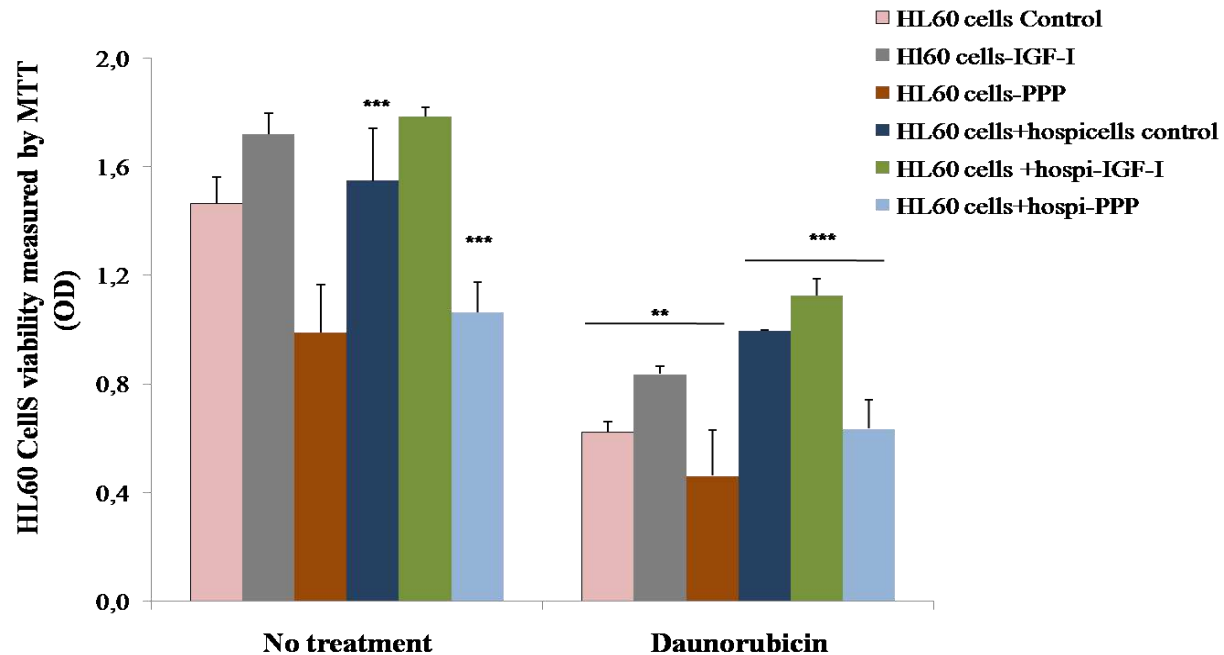
In this study, we wanted to confirm the implication of the IGF-I in the regulation of the ABC mRNA in HL60 cells co-cultivated with the hospicells isolated from the LAM (N3) bone marrow of. We chose this sample for its important percentage of hospicells, (6,77% on the total of the mesenchymal stromal cells). Figure 9 shows that HL60 cells co-cultivated with the hospicells from LAM N3 in the presence of IGF-I, express the ABC genes. On the other hand, by adding PPP, inhibitor of IGF-IR, in the medium of incubation, the expression of *MDR1* and *MRP1* decrease, like *BCRP* slightly. A low difference in expression of *MRP2* and *MRP5* was observed in presence or absence of PPP. These results are very important and suggest that IGF-I was secreted by the hospicells or HL60 cells and acts through autocrine or/and paracrine actions on the regulation of genes, *MDR1*, *MRP1*, *MRP2* and *BCRP* in leukemic cells.



**Figure 9. Inhibiting effect of PPP on the ABC genes expression in HL60 cells co-cultivated with hospicells.** HL60 cells co-cultivated with hospicells from LAM N3 bone marrow during 12h in presence or not of PPP. A RT-PCR was carried out to study the expression of the ABC genes: *MDR1*, *MRP1*, *MRP2*, *MRP3*, *MRP5* and *BCRP*.

#### **10- Induction of chemoresistance by interactions of HL60 cells-hospicells in the presence of IGF-I.**

HL60 leukemic cells co-cultivated with the hospicells from AML N3 bone marrow in presence of IGF-I or PPP during 24h at 37°C. We analyzed if the contact hospicells and HL60 cells in the presence of IGF-I could induce a resistance of these sensitive cells against daunorubicin. The results obtained show that under the conditions without treatment, HL60 sensitive cells proliferate more with IGF-I and its growth strongly decreases with inhibitor PPP, which confirms our preceding results. In the presence of the hospicells, we note an increase of the number of living HL60 cells compared to the cells controls. This proliferation of HL60 cells increases even more with the addition of IGF-I in the culture medium. In the presence of daunorubicin, HL60 cells acquire a resistance to the daunorubicin compared to cells controls (figure 10). This drug resistance acquired strongly decreases with inhibitor PPP. HL60 cells adhered on the hospicells show a clear resistance to daunorubicin. Moreover, this drug resistance develops in the presence of IGF-I and decreases with PPP. These results confirm our hypothesis and show that in addition to the role of IGF-I in the regulation of the ABC genes expression, mainly *MDR1*, this growth amplifies the protection of leukemic cells HL60 by the hospicells against the agents of chemotherapy, daunorubicin.

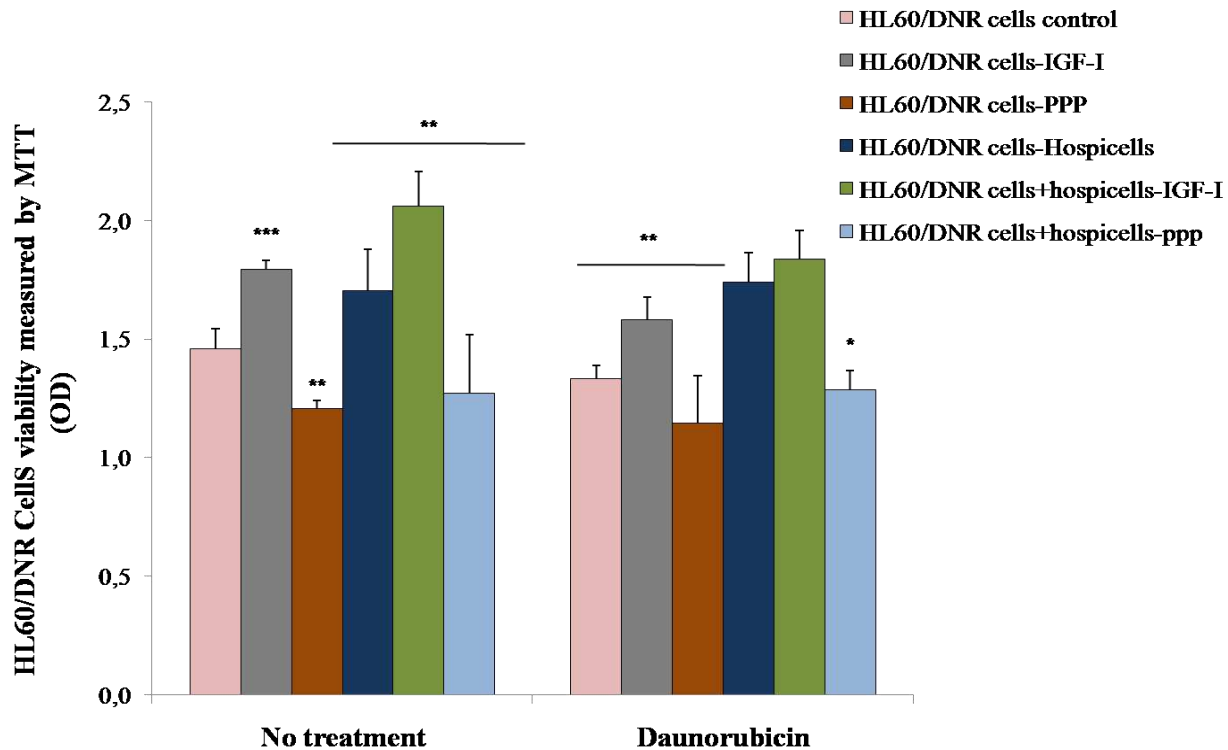


**Figure 10: Hospicells protect HL60 cell line against daunorubicin.** HL60 cells sensitive co-cultivated with the hospicells in the presence of IGF-I or PPP during 24h. The chemotherapy agent, daunorubicin was added in the culture media and incubated during 24h. Average  $\pm$  SE, (n=3), the difference in expression is significant (\*P < 0.05, \*\*\* P < 0.005) compared with the cells controls untreated.

#### **11- Interaction of HL60/DNR cells-hospicells in the presence of IGF-I and chemoresistance.**

We have demonstrated previously, the importance of the presence of the host cells (hospicells) and the secretion of the growth factor IGF-I, in the acquisition of the chemoresistance by sensitive cells, HL60. We thus realized a study, under the same conditions as the preceding experiment, but with resistant cells HL60/DNR. We observed that under conditions without treatment, the proliferation of these resistant cells is stimulated by IGF-I, whereas it is reduced by inhibitor PPP (Figure 11). The interaction hospicells-HL60/DNR cells increases the proliferation of the resistant leukemic cells which amplifies in the presence of IGF-I. HL60/DNR cells resist against the daunorubicin and this resistance significantly more increases with IGF-I. The inhibition of IGF-IR by PPP decreases this drug resistance. In the presence of the hospicells, the resistance of

HL60/DNR cells against the daunorubicin increases, this one evolving slightly when IGF-I is added. In the presence of the IGF-IR inhibitor, PPP, the HL60/DNR cells number decrease in significant manner.



**Figure 11. HL60/DNR cells-hospicells interaction and drug resistance in the presence of IGF-I.**

HL60/DNR cells co-cultivated with Hospicells from LAM N3 in the presence of IGF-I or PPP during 24h and were incubated thereafter with the daunorubicin. The number of HL60/DNR cells was evaluated by using the technique of MTT. Average  $\pm$  SE, (n=3), the difference in expression is significant (\*P < 0.05, \*\*\* P < 0.005).

## Discussion:

The chemoresistance of the tumoral cells against the chemotherapeutic agents is the major problem encountered during the treatments of leukemia. This phenomenon is in particular due, in much malignant leukemia and the multiple myeloma, with the action of protein P-gp, coded by *MDR1* gene. Several studies shows that IGF-I plays a part in the progression of the malignant hematologic diseases such as the myeloma (Qiang *et al.*, 2002) and myeloide leukemia (Rodon *et al.*, 2008).

There are two insulin-like growth factors: IGF-I and IGF-II. Insulin-like Growth Factor-I binds to two distinct cell surface receptors named IGF Receptor-I (IGF-IR), and the insulin receptor (INSR). The binding of IGF-I/IGF-IR occurs at a higher affinity than IGF-I/INSR binding. IGF-IR is a transmembrane receptor tyrosine kinase and is activated by IGF-I and IGF-II (Gregory *et al.*, 2001; Macaulay, 1992; Burren *et al.*, 1996). IGF-II binds to the IGF-II receptor and acts as a signaling antagonist. IGF-I and IGF-II form complexes with insulin-like growth factor binding protein (IGFBP).

During this work, we, initially, sought to define the characteristics of the myeloide cell lines, sensitive and resistant to the agents of chemotherapy (Doxorubicin and Daunorubicin), by studying the expression of *MDR1* and its protein P-gp. We indeed showed that the resistant leukemic cell lines strongly express *MDR1* and P-gp whereas the sensitive cells do not express them. These results assure us that protein P-gp belonged to the principal pumps leading to the resistance of our leukemic cellular lines. We thus studied these cells by forming two groups, one containing the sensitive cells and the other the resistant cells in order to make a comparative study. Then, we highlighted the proliferative effect of IGF-I on these leukemic lines, which they are sensitive or resistant, and then we studied their respective sensitivity to the effect of the inhibitor of IGF-IR, PPP. The results show that the basal level of proliferation of the resistant cells is more important than that of the sensitive cells; the addition of IGF-I stimulates the two cell lines roughly same manner. However, the resistant cells are less sensitive to the effect PPP if one compares them with the sensitive leukemic cells, cultivated under the same conditions of culture. We put forth the assumption that it could be due to the fact that the resistant cells secrete more IGF-I than the sensitive cells, and then this IGF-I activated them by autocrine effect. Thus, the exogenic IGF-I does nothing but amplify the proliferation of these cells. The lowest resistant sensitivity to the

effect PPP of the cells is, it, perhaps due to the increased quantity of IGF-I secreted in microenvironnement, the growth promoter entering then in a more important way in competition with PPP for their fixing on IGF-IR. We were then interested in the regulation of gene MDR1 and protein P-gP by IGF-I in the sensitive and resistant cells. We observed an induction of the expression of MDR1 and P-gP in the sensitive cells, whereas contrary, this expression only was very slightly increased in the resistant cells. Our assumption is that the resistant cells already express to the maximum the PGP, and that they cannot answer any more additional stimulation of IGF-I. The inhibition of IGF-IR reduces the expression of P-gP to a significant degree in the resistant cells.

These results show well the role of IGF-I in the regulation of MDR1 and its protein P-gP in the leukemic cells, whatever their levels of capacity of resistance to chemotherapy. Following these results, we wanted to know if other genes ABC, in addition to *MDR1*, were expressed in the studied leukemic cells, and if there was a difference in expression between the sensitive and resistant cells. We noted that there was little difference in basal expression for the genes ABC between the sensitive cells and the resistant cells, contrary to the expression of P-gp which is, consequently, the only pump from which the expression differs under these conditions. A result, which drew all our attention, is the expression of *MRP3* and *BCRP* in the cells K562 and its K562/Dox derivative. Indeed, the expression of these two genes is weak in a basal state, but strongly increases under the effect IGF-I. This expression decreases, and even disappears completely, with the inhibitor of IGF-IR. Complementary studies will be necessary to better include/understand the mode of action of the pumps ABC, even of other pumps, like the LRP for example, a pump which does not belong to the ABC family but which is very implied in the chemoresistance against the anthracyclines in order to study her effect on the chemioresistance. On the other hand, we observed that the form of gene MRP5 is not controlled by the ways of indications activated by IGF-I. While being based on the preceding results on the ovarian cancer, like on the results on some other cancers, it is shown that the inhibition of IGF-IR can induce a reduction in expression of P-gp as well as the reduction of the chemoresistance (Hopkins *et al*, 2010). We wanted to study the form of the genes ABC in leukemic cells HL60 in a base line and in the presence of a number growing of hospicells isolated from bone marrow, and which express

*MDR1* gene and IGF-IR. The interaction between a number growing of hospicells isolated from marrows and cells HL60 induce an increasing expression of the genes ABC, except for *MRP5* which remains stable. The addition of an inhibitor of IGF-IR causes a reduction in the induced expression of the genes ABC, without however inhibiting them completely. We thus suggest that the hospicells secrete other factors suitable for activate the genes ABC. It would be interesting to identify these factors and to study their mechanisms of action. We highlighted the effect of the regulation of IGF-IR on the expression of protein P-gP in the leukemic cells. Thus, the addition of IGF-I increases the expression of protein P-gP, whereas the addition of PPP, inhibitor of IGF-IR, decreases the expression of this protein. The co-cultures of hospicells and leukemic cells sensitive to the chemotherapeutic agents showed that the hospicells were able to transmit the character of resistance to these agents in the sensitive cells. The mechanism is not identified yet, even if assumptions exist (activation of the *MDR1* gene by the IL-6 secreted by the hospicells or phenomenon of trogocytose). Studies are necessary to elucidate the implied mechanisms. In parallel, we carried out the same experiment, but in the presence of resistant leukemic cells. The results showed that the resistant character of the tumoral cells was slightly improved (increased proliferation), probably due to the secretion of IGF-I by the hospicells. The inhibition of receiver IGF-IR decreases the character of resistance of cells HL60/DNR, but in an insufficient way to be effective.

The importance of the IGF signaling axis to cancer development, progression, and metastatic spread cannot be fully appreciated by simple analysis of the expression levels of the IGF1R and its ligands alone. Furthermore, the significance of IGF and IGF1R expression levels as indicators of tumor stage or disease prognosis tends to track in a tumor-specific fashion. Our results demonstrate that tumor stroma cells have a crucial role in physiopathology response to IGF-1/IGF-1R.

*In vitro* studies, then *in vivo*, carried out in the multiple myeloma, used molecules targeting and inhibiting IGF-1R. This resulted in to decrease the formation of the tumor and to reduce the phenomenon of angiogenesis by the reduction in the action of VEGF, controlled by IGF-IR (Wu *et al* 2007). Thus, several inhibitors were used during clinical trials, but their use led to failures. Our



objective was thus to thoroughly interest us in the stroma cells isolated from bone marrow, able to interact with the leukemic cells, in order to identify new therapeutic approaches.

## References

1. Abe S, Funato T, Takahashi S, Yokoyama H, Yamamoto J, Tomiya Y, Yamada-Fujiwara M, Ishizawa K, Kameoka J, Kaku M, Harigae H, Sasaki T. Increased expression of insulin-like growth factor I is associated with Ara-C resistance in leukemia. *Tohoku J Exp Med*. 2006 Jul;209(3):217-28.
2. Baier TG, Jenne EW, Blum W, Schönberg D, Hartmann KK. Influence of antibodies against IGF-I, insulin or their receptors on proliferation of human acute lymphoblastic leukemia cell lines. *Leuk Res*. 1992 Aug;16(8):807-14.
3. Baudard M, Beauchamp-Nicoud A, Delmer A, Rio B, Blanc C, Zittoun R, Marie JP. Has the prognosis of adult patients with acute myeloid leukemia improved over years? A single institution experience of 784 consecutive patients over a 16-year period. *Leukemia*. 1999 Oct;13(10):1481-90.
4. Burren C.P., Berka J.L., Edmondson S.R., Werther G.A., Batch J.A. Localization of mRNAs for insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-I receptor, and IGF binding proteins in rat eye. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:1459-68.
5. Doeppfner KT, Spertini O, Arcaro A. Autocrine insulin-like growth factor-I signaling promotes growth and survival of human acute myeloid leukemia cells via the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Leukemia*. 2007 Sep;21(9):1921-30.
6. Gilmore MJ, Prentice HG, Blacklock HA, Janossy G, Hoffbrand AV. A technique for rapid isolation of bone marrow mononuclear cells using Ficoll-Metrizoate and the IBM 2991 blood cell processor. *Br J Haematol*. 1982 Apr;50(4):619-26.
7. Girnita A, Girnita L, del Prete F, Bartolazzi A, Larsson O, Axelson M. Cyclolignans as Inhibitors of the Insulin-Like Growth Factor-1 Receptor and Malignant Cell Growth *Cancer Research* 64, 236-242, 2004]

8. Gregory C.W., DeGeorges A., Sikes R.A. The IGF axis in the development and progression of prostate cancer. *Recent Research Developments in Cancer*. 2001;437-462.
9. Guo YS, Jin GF, Houston CW, Thompson JC, Townsend CM Jr. Insulin-like growth factor-I promotes multidrug resistance in MCLM colon cancer cells. *J Cell Physiol*. 1998 May;175(2) : 141-8.
10. He Y, Zhang J, Zheng J, Du W, Xiao H, Liu W, Li X, Chen X, Yang L, Huang S. The insulin-like growth factor-1 receptor kinase inhibitor, NVP-ADW742, suppresses survival and resistance to chemotherapy in acute myeloid leukemia cells. *Oncol Res*. 2010;19(1):35-43
11. Héron-Milhavet L, LeRoith D. Insulin-like growth factor I induces MDM2-dependent degradation of p53 via the p38 MAPK pathway in response to DNA damage. *J Biol Chem*. 2002 ; May 3;277(18):15600-6. Epub 2002 Feb 27
12. Hopkins A, Crowe PJ, Yang JL. Effect of type 1 insulin-like growth factor receptor targeted therapy on chemotherapy in human cancer and the mechanisms involved. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 May;136(5):639-50. Epub 2010 Feb 6. Review.
13. Kuhn DJ, Berkova Z, Jones RJ, Woessner R, Bjorklund CC, Ma W, Davis RE, Lin P, Wang H, Madden TL, Wei C, Baladandayuthapani V, Wang M, Thomas SK, Shah JJ, Weber DM, Orlowski RZ. Targeting the insulin-like growth factor-1 receptor to overcome bortezomib resistance in preclinical models of multiple myeloma. *Blood*. 2012 Oct 18;120(16):3260-70.
14. Macaulay V. M. Insulin-like growth factors and cancer. *Br J Cancer*. 1992;65:311-320.
15. Mirshahi P, Rafii A, Vincent L, Berthaut A, Varin R, Kalantar G, Marzac C, Calandini OA, Marie JP, Soria C, Soria J, Mirshahi M. Vasculogenic mimicry of acute leukemic bone marrow stromal cells. *Leukemia*. 2009 Jun;23(6):1039-48.
16. Qiang YW, Kopantzev E, Rudikoff S. Insulinlike growth factor-I signaling in multiple myeloma: downstream elements, functional correlates, and pathway cross-talk. *Blood*. 2002;99:4138-4146.
17. Rodon J, DeSantos V, Ferry RJ, Jr, Kurzrock R. Early drug development of inhibitors of the insulin-like growth factor-I receptor pathway: lessons from the first clinical trials. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(9):2575–88
18. Samani AA, Yakar S, Le Roith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev*. 2007 ; Feb;28(1):20-47

19. Schwarze CP, Neu S, Beck J, Mavridou K, Ranke MB, Binder G. Influence of IGF-I and cell density on MDR1 expression in the T-lymphoblastoid cell line CCRF-CEM. *Horm Res.* 1999;52(4):192-9.
20. Shimon I, Shpilberg O. The insulin-like growth factor system in regulation of normal and malignant hematopoiesis. *Leuk Res.* 1995 Apr;19(4):233-40.
21. Wu KD, Zhou L, Burtrum D, Ludwig DL, Moore MA. Antibody targeting of the insulinlike growth factor I receptor enhances the anti-tumor response of multiple myeloma to chemotherapy through inhibition of tumor proliferation and angiogenesis. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56:343-357
22. Wu X, Tortolero-Luna G, Zhao H, Phatak D, Spitz MR, Follen M. Serum levels of insulin-like growth factor I and risk of squamous intraepithelial lesions of the cervix. *Clin Cancer Res.* 2003 Aug 15;9(9):3356-61.
23. Yang SY, Winslet M. The IGF system in carcinogenesis and its implication for cancer therapy. *Curr Oncol.* 2011 Dec;18(6):301-2.

## **Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis**

Pasquet M, Golzio M, Mery E, Rafii A, Benabbou N, Mirshahi P, Hennebelle I, Bourin P, Allal B, Teissie J, Mirshahi M, Couderc B. Int J Cancer. 2010;126 : 2090-101.

Dans cette étude, nous avons déterminé les caractéristiques moléculaires des hospicells en étudiant l'expression d'une gamme de molécules très impliquées dans le développement des cancers : facteurs de croissance, interleukines et cytokines.

Des études *in vivo*, réalisées dans le but de déterminer le rôle des hospicells dans la progression des cancers de l'ovaire, montrent que ces cellules hôte favorisent la prolifération des cellules du cancer de l'ovaire en augmentant le processus de l'angiogenèse *via* VEGF.

**Matrix metalloproteinase-9 is required for tubular network formation and migration of resistant breast cancer cells MCF-7 through PKC and ERK1/2 signalling pathways.**

Karroum A, Mirshahi P, Benabbou N, Faussat AM, Soria J, Therwath A, Mirshahi M, Hatmi M. Cancer Lett. 2010 Sep 28;295(2):242-51. Epub 2010 Mar 31.

La métalloprotéinase matricielle-9 (MMP-9) influe fortement sur le développement des tumeurs et la formation des métastases. Dans cette étude, nous avons montré, d'une part, que MMP9 est surexprimée dans les cellules résistantes du cancer du sein exprimant la protéine P-gp et, d'autre part, que son action est nécessaire pour la migration cellulaire et la formation du réseau tubulaire, deux processus impliqués dans la croissance tumorale et la formation des métastases. Ces résultats suggèrent qu'il peut y avoir un lien étroit entre l'expression de MMP-9 et le phénomène de la multi-résistance des cellules tumorales

Nous avons également montré que l'activation de MMP9 dépend de deux voies de signalisations, PKC et ERK1/2.

## VII. Conclusion

Nos études confirment le rôle central d'IGF-I et de son récepteur IGF-IR dans la régulation de la prolifération des cellules tumorales, d'une part, et dans l'acquisition ou le renforcement du caractère de résistance face aux agents chimiothérapeutiques, d'autre part. Cependant, l'inhibition de l'action de IGF-I au travers d'inhibiteur spécifique n'est pas suffisante, ainsi que le montre l'échec des traitements n'utilisant que cette méthode. Nous suggérons ainsi de prendre en considération l'action du microenvironnement, et notamment des cellules stromales « hospicells », sur la chimiorésistance des cellules tumorales.

Il serait intéressant de trouver des marqueurs spécifiques de ces cellules hôtes afin de pouvoir les cibler et éventuellement réduire la chimiorésistance des cellules tumorales. Ces nouveaux traitements pourraient se combiner avec des traitements anti-IGF-I pour une meilleure efficacité.

Nous avons également mis en évidence le rôle de MMP-9 dans le processus d'angiogenèse pour des cellules cancéreuses exprimant la protéine P-gp, suggérant qu'il peut y avoir un lien entre ces deux protéines. Il serait intéressant d'utiliser la protéine MMP-9 comme une cible thérapeutique pour lutter contre la chimiorésistance des cellules cancéreuses.

## Références

1. Abdel-Ghany M, Cheng HC, Elble RC, Pauli BU. Focal adhesion kinase activated by beta(4) integrin ligation to mCLCA1 mediates early metastatic growth. *J Biol Chem*. 2002 Sep 13;277(37):34391-400. Epub 2002 Jul 10.
2. Albelda SM, Mette SA, Elder DE, Stewart R, Damjanovich L, et al. Integrin distribution in malignant melanoma : association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res*. 1990 ; 50, 6757-64
3. André F, Rigot V, Thimonier J, Montixi C, Parat F, et al. Integrins and E-cadherin cooperate with IGF-I to induce migration of epithelial colonic cells. *Int J Cancer*. 1999 ; Nov 12;83(4):497-505
4. Assoian RK, Marcantonio EE. The extracellular matrix as a cell cycle control element in atherosclerosis and restenosis. *J Clin Invest*. 1996 Dec 1;98(11):2436-9.
5. Avraamides CJ, Garmy-Susini B, Varner JA. Integrins in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2008 ; Aug;8(8):604-17
6. Ayala F, Dewar R, Kieran M, Kalluri R. Contribution of bone microenvironment to leukemogenesis and leukemia progression. *Leukemia*. 2009 ; Dec;23(12):2233-41
7. Baay M, Brouwer A, Pauwels P, Peeters M, Lardon F. Tumor cells and tumor-associated macrophages : secreted proteins as potential targets for therapy. *Clin Dev Immunol*. 2011; 2011:565187
8. Balkwill F, Mantovani A Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001 17;357(9255):539-45. Review.
9. Bauer TW, Liu W, Fan F, Camp ER, Yang A, et al. Targeting of urokinase plasminogen activator receptor in human pancreatic carcinoma cells inhibits c-Met- and insulin-like growth factor-I receptor-mediated migration and invasion and orthotopic tumor growth in mice. *Cancer Res*. 2005 ; Sep 1;65(17):7775-81
10. Baudard M, Beauchamp-Nicoud A, Delmer A, Rio B, Blanc C, Zittoun R, Marie JP. Has the prognosis of adult patients with acute myeloid leukemia improved over years? A single

institution experience of 784 consecutive patients over a 16-year period. *Leukemia*. 1999 Oct;13(10):1481-90.

11. Bergers G, Brekken R, McMahon G, Vu TH, Itoh T, Tamaki K, Tanzawa K, Thorpe P, Itohara S, Werb Z, Hanahan D. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat Cell Biol*. 2000 ; Oct;2(10):737-44
12. Bowers SL, Banerjee I, Baudino TA. The extracellular matrix : at the center of it all. *Cardiol J Mol Cell*. 2010 ; Mar;48 : 474-82
13. Brábek J, Mierke CT, Rösel D, Veselý P, Fabry B. The role of the tissue microenvironment in the regulation of cancer cell motility and invasion. *Cell Commun Signal*. 2010 ; Sep 7;8:22
14. Burger JA et Gandhi V. The lymphatic tissue microenvironments in chronic lymphocytic leukemia: in vitro models and the significance of CD40-CD154 interactions. *Blood*. 2009 ; 114:2560–2561
15. IGFBP Butt AJ, Williams AC -3 and apoptosis--a license to kill?, *Apoptosis*. 2001 Jun;6(3):199-205.
16. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000 ; 407(6801):249-57
17. Cen L, Liu W, Cui L, Zhang W, Cao Y Collagen tissue engineering: development of novel biomaterials and applications. *Pediatr Res*. 2008 May;63(5):492-6.
18. Chad E. Green, Tiffany Liu, Valerie Montel, Gene Hsiao, Robin D. Lester, et al. Chemoattractant Signaling between Tumor Cells and Macrophages Regulates Cancer Cell Migration, Metastasis and Neovascularization. *PLoS One*. 2009; 4(8): e6713
19. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science*. 2004 Feb 13;303(5660):1010-4.
20. Chitnis MM, Yuen JS, Protheroe AS, Pollak M, Macaulay VM. The type 1 insulin-like growth factor receptor pathway. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct 15;14(20):6364-70.
21. Choi MR, Stanton-Maxey KJ, Stanley JK, Levin CS, Bardhan R, et al. A cellular Trojan Horse for delivery of therapeutic nanoparticles into tumors. *Nano Lett*. 2007 ; 7:3759–3765



22. Clarke AS, Lotz MM, Mercurio AM. A novel structural variant of the human beta 4 integrin cDNA. *Cell Adhes Commun.* 1994 Apr;2(1):1-6.
23. Clemmons DR. Modifying IGF1 activity: an approach to treat endocrine disorders, atherosclerosis and cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2007 ; 6:821-833
24. Coats S, Flanagan WM, Nourse J, Roberts JM. Requirement of p27Kip1 for restriction point control of the fibroblast cell cycle. *Science.* 1996 ; 272:877–880
25. Collett-Solberg PF, Cohen P. The role of the insulin-like growth factor binding proteins and the IGFBP proteases in modulating IGF action. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1996 Sep;25(3):591-614.
26. Cordes N, Park CC. beta1 integrin as a molecular therapeutic target. *Int J Radiat Biol.* 2007 ; Nov-Dec;83(11-12):753-60
27. Cornelius LA, LC Nehring, Harding E, M Bolanowski, Welgus HG, et al. Matrix metalloproteinases generate angiostatin: effects on neovascularization. *J Immunol.* 1998 ; Dec 15;161(12):6845-52
28. Coussens, L.M.et Werb Z. Inflammation and Cancer. 2000, *Nature* 420, 860-867
29. Dassa E, Bouige P. The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. *Res Microbiol.* 2001 ; Apr-May;152(3-4):211-29
30. Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, Wallace JC, Forbes BE. Molecular interactions of the IGF system. *Cytokin Growth factor Rev.* 2005 ; 16:421-439
31. Di Cristofano A et Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell.* 2000 ; Feb 18;100(4):387-90.
32. Ding J, Li D, Wang X, Wang C, Wu T. Fibronectin promotes invasiveness and focal adhesion kinase tyrosine phosphorylation of human colon cancer cell. *hépatogastroentérologie. Hepatogastroenterology.* 2008 ; Nov-Dec;55(88):2072-6
33. Delehedde M., Lyon M., Sergeant N., Rahmoune H. & Fernig D.G. Proteoglycans : pericellular and cell surface multireceptors that integrate external stimuli in the mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2011 ; 6, 253-73
34. Leyva-Illades D, McMillin M, Quinn M, Sharon DeMorrow. Cholangiocarcinoma pathogenesis: Role of the tumor microenvironment. 2012

35. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006 ; 8 : 315-7
36. Ducros E, Berthaut A, Mirshahi P, Lemarchand S, Soria J, et al. Expression of extracellular matrix proteins fibulin-1 and fibulin-2 by human corneal fibroblasts. *Curr Eye Res.*2007 ; 32:481–490
37. Dupont J, Karas M, LeRoith D. The potentiation of estrogen on insulin-like growth factor I action in MCF-7 human breast cancer cells includes cell cycle components. *J Biol Chem.* 2000 ; Nov 17;275(46):35893-901
38. Dupont J, LeRoith D. Insulin and insulin-like growth factor I receptors: similarities and differences in signal transduction. *Horm Res.* 2001 ; 55 Suppl 2:22-26
39. Ebos JM, Lee CR, Kerbel RS. Tumor and host-mediated pathways of resistance and disease progression in response to antiangiogenic therapy. *Clin Cancer Res.* 2009 Aug 15;15(16):5020-5.
40. Engert, K.D., Alleva, D.G., Mullins, D.W. Tumors-induced immune dysfunction: the macrophage connection. 1998, *J Leukoc Biol* 64, 275-90
41. Elmer Hoekstra, Maikel P. Peppelenbosch, Gwenny M. Fuhler. The role of protein tyrosine phosphatases in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2012 ; Aug;1826(1):179-88. Epub
42. Engelman JA, Mukohara T, Zejnullahu K, Lifshits E, Borrás AM, et al., Allelic dilution obscures detection of a biologically significant resistance mutation in EGFR-amplified lung cancer. 2006 ; *J Clin Invest.* 2006 ; Oct;116(10):2695-706
43. Fang, J. Matrix metalloproteinase-2 is required for the switch to the angiogenic phenotype in a tumor model. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 ; Apr 11;97(8):3884-9
44. Feldser D, Agani F, Iyer NV, Pak B, Ferreira G, et al. GL1999 Reciprocal positive regulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  and insulin-like growth factor 2. *Cancer Res.* 1999 ; Aug 15;59(16):3915-8
45. Ferrara et Kerbel. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature.* 2005 ; Dec 15;438(7070):967-74
46. Ferrara, N. Leukocyte adhesion. Missing link in angiogenesis. *Nature.* 1995 ; Aug 10;376(6540):467

47. Flaumenhaft R, Rifkin DB. The extracellular regulation of growth factor action. *Mol Biol Cell.* 1992 ; Oct;3(10):1057-65
48. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med.* 1971 ; Nov 18;285(21):1182-6
49. Fowlkes JL, Enghild JJ, Suzuki K, Nagase H. Matrix metalloproteinases degrade insulin-like growth factor-binding protein-3 in dermal fibroblast cultures. *J Biol Chem.* 1994 ; Oct 14;269(41):25742-6
50. Franco OE, Shaw AK, Strand DW, Hayward SW. Cancer associated fibroblasts in cancer pathogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 2010 ; Feb;21(1):33-9
51. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, et al. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem.* 2002 ; Oct 11;277(41):38205-11
52. Furlanetto RW, Harwell SE, Frick KK. Insulin-like growth factor-I induces cyclin-D1 expression in MG63 human osteosarcoma cells in vitro. *Mol Endocrinol.* 1994 ; 8:510–517
53. Gasparini G, Longo R, Toi M, Ferrara N. Angiogenic inhibitors: a new therapeutic strategy in oncology. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005 Nov;2(11):562-77.
54. Gehler S, Baldassarre M, Lad Y, Leight JL, Wozniak MA, et al. Filamin A-beta1 integrin complex tunes epithelial cell response to matrix tension. *Mol Biol Cell.* 2009 ; Jul;20(14):3224-38
55. Geiger B, Bershadsky A, Pankov R, Yamada KM. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix--cytoskeleton crosstalk. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001 Nov;2(11):793-805.
56. Ginsberg MH, Partridge A, Shattil SJ. Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 2005 ; Oct;17(5):509-16
57. Gordon MY, Clarke D, Atkinson J, Greaves MF. Hemopoietic progenitor cell binding to stroma microenvironment in vitro. *Exp Hematol.* 1990 ; 18 : 837-42
58. Greer EL et Brunet A. FOXO transcription factors at the interface between longevity and tumor suppression. *Oncogene.* 2005 ; Nov 14;24(50):7410-25

59. Grivennikov S, Karin M. Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis? *Cancer Cell*. 2008 Jan;13(1):7-9.
60. Gual P, Baron V, Lequoy V, Van Obberghen E. Interaction of Janus kinases JAK-1 and JAK-2 with the insulin receptor and the insulin-like growth factor-1 receptor. *Endocrinology*. 1998 ; 139:884–893
61. Guvakova MA, Adams JC, Boettiger D. Functional role of alpha-actinin, PI 3-kinase and MEK1/2 in insulin-like growth factor I receptor kinase regulated motility of human breast carcinoma cells. *J Cell Sci*. 2002 ; Nov 1;115(Pt 21):4149-65
62. Hall B, Andreeff M, Marini F. The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol*. 2007 ; (180):263-83
63. Héron-Milhavet L, LeRoith D. Insulin-like growth factor I induces MDM2-dependent degradation of p53 via the p38 MAPK pathway in response to DNA damage. *J Biol Chem*. 2002 ; May 3;277(18):15600-6. Epub 2002 Feb 27
64. Hieken TJ, Farolan M, Ronan A., Shilkaitis, Wild L, et al. Beta3 integrin expression in melanoma predicts subsequent metastasis. *J Surg res*. 1996 ; 63, 169-73
65. Hille S, Rein DT, Riffelmann M, Neumann R, Sartorius J, et al. Anticancer drugs induce *mdr1* gene expression in recurrent ovarian cancer. *Anticancer Drugs*. 2006 ; Oct;17(9):1041-4
66. Hopkins A, Crowe PJ, Yang JL. Effect of type 1 insulin-like growth factor receptor targeted therapy on chemotherapy in human cancer and the mechanisms involved. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 May;136(5):639-50. Epub 2010 Feb 6.
67. Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem*. 1992 ; Dec 25;267(36):26031-7
68. Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan KL. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signaling. *Nat Cell Biol*. 2002 ; Sep;4(9):648-57
69. Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, et al. Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res*. 1998 Mar 1;58(5):1048-51
70. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008 ; Mar-Apr;58(2):71-96

71. Jones JJ, Clemmons DR. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. 1995 ; *Endocr Rev* 16:3–34
72. Julie Laferrière, François Houle and Jacques Huot . Adhesion of HT-29 colon carcinoma cells to endothelial cells requires sequential events involving E-selectin and integrin  $\beta 4$ . *Clin Exp Metastasis*. 2004 ; 21(3):257-64
73. Kalluri R et Zeisberg E. Controlling angiogenesis in heart valves. *Nat Med*. 2006 ; Oct;12(10):1118-9
74. Kanakura Y, Ikeda H, Kitayama H, Sugahara H, Furitsu T. Expression, function and activation of the proto-oncogene c-kit product in human leukemia cells. *Leuk Lymphoma*. 1993 ; May;10(1-2):35-41
75. Kannagi R, Izawa M, Koike T, Miyazaki K, Kimura N. Carbohydrate-mediated cell adhesion in cancer metastasis and angiogenesis. *Cancer Sci*. 2004 May;95(5):377-84
76. Karnoub AE, Dash AB, Vo AP, Sullivan A, Brooks MW, et al. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 2007 ; Oct 4;449(7162):557-63
77. Kawai M, Rosen CJ. Bone: adiposity and bone accrual-still an established paradigm? *Nat Rev Endocrinol*. 2010 Feb;6(2):63-4.
78. Kelley KM, Oh Y, Gargosky SE, Gucev Z, Matsumoto T, Hwa V, Ng L, Simpson DM, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factor-binding proteins (IGFBPs) and their regulatory dynamics. *Int J Biochem Cell Biol*. 1996 Jun;28(6):619-37.
79. Kerbel RS. Tumor angiogenesis. *N Engl J Med*. 2008 ; 358. (19) :2039-2049
80. Khakoo AY, Pati S, Anderson SA, Reid W, Elshal MF, et al. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *J Exp Med*. 2006 ; May 15;203(5):1235-47
81. Kidd S, Spaeth E, Klopp A, Andreeff M, Hall B, Marini FC. The (in) auspicious role of mesenchymal stromal cells in cancer: be it friend or foe. *Cytotherapy*. 2008;10(7):657-67.
82. Kim HT, Choi BH, Niikawa N, Lee TS, Chang SI. Frequent loss of imprinting of the H19 and IGF-II genes in ovarian tumors. *Am J Med Genet*. 1998 ; 80:391-395
83. Kitadai Y, Sasaki T, Kuwai T, Nakamura T, Bucana CD, et al. Targeting the expression of platelet-derived growth factor receptor by reactive stroma inhibits growth and metastasis of human colon carcinoma. *Am J Pathol*. 2006 ; 169 :2054–2065

84. Kodama Y, Baxter RC, Martin JL. Insulin-like growth factor-I inhibits cell growth in the a549 non-small lung cancer cell line. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2002 ; Sep;27(3):336-44
85. Kresimir Pavelic, Damir Bukovic, and Jasminka Pavelic. The Role of Insulin-Like Growth Factor 2 and Its Receptors in Human Tumors. *Molecular Medicine*. 2002 ; 8(12): 771–780
86. Krishna R, et Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2000 ; 11: 265–283
87. Laferrière J, Houle F, Huot J. Adhesion of HT-29 colon carcinoma cells to endothelial cells requires sequential events involving E-selectin and integrin beta4. *Clin Exp Metastasis*. 2004 ; 21(3):257-64
88. Lam S. et al., Glucose-induced fibronectin and collagen type III expression in renal fibroblasts can occur independent of TGF-beta1. *Kidney Int*. 2003 ; Mar;63(3):878-88
89. Lee OH, Bae SK, Bae MH, Lee YM, Moon EJ, et al. Identification of angiogenic properties of insulin-like growth factor II in in vitro angiogenesis models. *Br J Cancer*. 2000 ; Jan;82(2):385-91
90. LeRoith D, Roberts CT Jr. The insulin-like growth factor system and cancer. *Cancer Lett*. 2003 Jun 10;195(2):127-37.
91. Lewis CE, Pollard JW. Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Res*. 2006; 66 (2):605–612.
92. Li DM et Sun H. TEP1, encoded by a candidate tumor suppressor locus, is a novel protein tyrosine phosphatase regulated by transforming growth factor beta. *Cancer Res*. 1997 ; Jun 1;57(11):2124-9
93. Liao D, Johnson RS. Hypoxia: a key regulator of angiogenesis in cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2007 ; 26 (2):281–290
94. Lis R, Touboul C, Raynaud CM, Malek JA, Suhre K, et al. Mesenchymal cell interaction with ovarian cancer cells triggers pro-metastatic properties. *PLoS One*. 2012 ; 7(5): e38340
95. Liu B, Lee HY, Weinzimer SA, Powell DR, Clifford JL, et al. Direct functional interactions between insulin-like growth factor-binding protein-3 and retinoid X receptor-alpha regulate transcriptional signaling and apoptosis. *J Biol Chem*. 2000 ; Oct 27;275(43):33607-13

96. Liu YB, Qian HR, Hong DF, Wang JW, Li JT, et al., Mesenchymal stem cells inhibit the expression of CD25 on phytohaemagglutinin-activated lymphocytes. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2007 ; Aug 14;87(30):2136-9
97. Longley DB et Johnston PG. Molecular mechanisms of drug resistance. *J Pathol*. 2005 ; 205 : 275–292
98. Magzoub M, Jin S, Verkman AS. Enhanced macromolecule diffusion deep in tumors after enzymatic digestion of extracellular matrix collagen and its associated proteoglycan decorin. *FASEB J*. 2008 ; Jan;22(1):276-84. Epub 2007 Aug 29
99. Maile LA, Badley-Clarke J, Clemmons DR. The association between integrin-associated protein and SHPS-1 regulates insulin-like growth factor-I receptor signaling in vascular smooth muscle cells. *Mol Biol Cell*. 2003; 14:3519–3528
100. Mañes S, Llorente M, Lacalle RA, Gómez-Moutón C, Kremer L, et al. The matrix metalloproteinase-9 regulates the insulin-like growth factor-triggered autocrine response in DU-145 carcinoma cells. *J Biol Chem*. 1999 ; Mar 12;274(11):6935-45
101. Magzoub M, Jin S, Verkman AS. Enhanced macromolecule diffusion deep in tumors after enzymatic digestion of extracellular matrix collagen and its associated proteoglycan decorin. *FASEB J*. 2008 Jan;22(1):276-84..
102. Marastoni S, Ligresti G, Lorenzon E, Colombatti A, Mongiat M. Extracellular matrix: a matter of life and death. *Connect Tissue Res*. 2008;49(3):203-6.
103. McLean K, Gong Y, Choi Y, Deng N, Yang K, , et al. Human ovarian carcinoma–associated mesenchymal stem cells regulate cancer stem cells and tumorigenesis via altered BMP production. *J Clin Invest*. 2011 ; Aug;121(8):3206-19
104. Méjean A, Lebret T. The metastatic cascade: angiogenesis and new concepts]. *Prog Urol*. 2008 Nov;18 Suppl 7:S156-66.
105. Meinbach DS, Lokeshwar BL. Insulin-like growth factors and their binding proteins in prostate cancer: cause or consequence? *Urol Oncol*. 2006 ; 24:294-306
106. Merlo LM, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*. 2006; 6(12):924-35.

107. Midwood KS, Valenick LV, Hsia HC, Schwarzbauer JE. Coregulation of fibronectin signaling and matrix contraction by tenascin-C and syndecan-4. *Mol Biol Cell*. 2004 ; Dec;15(12):5670-7
108. Mira E, Manes S, Lacalle RA, Marquez G, Martinez AC. Insulin-like growth factor I-triggered cell migration and invasion are mediated by matrix metalloproteinase-9. *Endocrinology*. 1999 ; Apr;140(4):1657-64
109. Mirshahi P, Rafii A, Vincent L, Berthaut A, Varin R, et al. Vasculogenic mimicry of acute leukemic bone marrow stromal cells. *Leukemia*. 2009 ; Jun;23(6):1039-48
110. Mirshahi P, Toprak SK, Faussat AM, Dubrulle S, Marie JP, Soria C, Soria J, Mirshahi M. Malignant hematopoietic cells induce an increased expression of VEGFR-1 and VEGFR-3 on bone marrow endothelial cells via AKT and mTOR signalling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; Oct 27;349(3):1003-10.
111. Moelling K, Schad K, Bosse M, Zimmermann S, Schwenker M. Regulation of Raf-Akt Cross-talk. *J Biol Chem*. 2002 ; Aug 23;277(34):31099-106
112. Möhl C, Kirchgessner N, Schäfer C, Küpper K, Born S, et al. Becoming stable and strong: the interplay between vinculin exchange dynamics and adhesion strength during adhesion site maturation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2009 ; Jun;66(6):350-64
113. Morin PJ . Drug resistance and the microenvironment: nature and nurture. *Drug Resist Updat*. 2003 Aug;6(4):169-72
114. Moro-Sibilot D, Coudurier M, Lantuejoul S. Targeting insulin-like growth factors in the treatment of cancer. *Rev Mal Respir*. 2010 ; Oct;27(8):959-63
115. Mossaad Abdel-Ghany, Hung-Chi Cheng, Randolph C. Elble, and Bendicht U. Pauli. Focal Adhesion Kinase Activated by beta -4 Integrin Ligation to mCLCA1 Mediates Early Metastatic Growth. *J Biol Chem*. 2002 ; Sep 13;277(37):34391-400
116. Naranatt PP, Akula SM, Zien CA, Krishnan HH, Chandran B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces the phosphatidylinositol 3-kinase-PKC-zeta-MEK-ERK signaling pathway in target cells early during infection: implications for infectivity. *J Virol*. 2003 ; Jan;77(2):1524-39



117. Narita T, Kawakami-Kimura N, Kasai Y, Hosono J, Nakashio T, Matsuura N, Sato M, Kannagi R. Induction of E-selectin expression on vascular endothelium by digestive system cancer cells. *J Gastroenterol*. 1996 Apr;31(2):299-301
118. Nelson R.M, Venor A, Bevilacqua M.P, Linhardt R.J. & Stamenkovic I. Carbohydrate-protein interactions in vascular biology. *Annu Rev Cell Dev Bio*. 1995 ; 11, 601-31
119. Nguyen J, Gogusev J, Knapnougel P, Bauvois B, et al. Protein tyrosine kinase and p38 MAP kinase pathways are involved in stimulation of matrix metalloproteinase-9 by TNF-alpha in human monocytes. *Immunol Lett*. 2006 ; Jul 15;106(1):34-41
120. Oberst A, Bender C, Green DR. Living with death: the evolution of the mitochondrial pathway of apoptosis in animals. *Cell Death Differ*. 2008 Jul;15(7):1139-46. Epub 2008 May 2.
121. O'Gorman DB, Weiss J, Hettiaratchi A, Firth SM, Scott CD. Insulin-like growth factor-II/mannose 6-phosphate receptor overexpression reduces growth of choriocarcinoma cells in vitro and in vivo. *Endocrinology*. 2002 ; 143:4287-4294
122. Onogawa S, Kitadai Y, Tanaka S, Kuwai T, Kuroda T, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF)-C and VEGF-D expression by the organ microenvironment in human colon carcinoma. *Eur J Cancer*. 2004 ; 40 (10):1604–1609
123. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts in cancer: a novel tumor-promoting cell type. *Cell Cycle*. 2006 ; 5 (15):1597–1601
124. Ostman A et Augsten M . Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev*. 2009 ; Feb;19(1):67-73
125. Paik SS, Oh YH, Jang KS, Han HX, Cho SH. Uterine leiomyoma with massive lymphoid infiltration: case report and review of the literature. *Pathol Int*. 2004 May;54(5):343-8.
126. Párrizas M, LeRoith D. Insulin-like growth factor-1 inhibition of apoptosis is associated with increased expression of the bcl-xL gene product. *Endocrinology*. 1997; Mar;138(3):1355-8
127. Pasquet M, Golzio M, Mery E, Rafii A, Benabbou N, Mirshahi P, Hennebelle I, Bourin P, Allal B, Teissie J, Mirshahi M, Couderc B: Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer*. 2010; 1;126(9):2090-101,

128. Patterson BC, Sang QA. Angiostatin-converting enzyme activities of human matrilysin (MMP-7) and gelatinase B/type IV collagenase (MMP-9). *J Biol Chem.* 1997 ; Nov 14;272(46):28823-5
129. Peddareddigari VG, Wang D, Dubois RN. The tumor microenvironment in colorectal carcinogenesis. *Cancer Microenviron.* 2010 Mar 5;3(1):149-66.
130. Pietras K, Pahler J, Bergers G, Hanahan D. Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med.* 2008 ;5 :19
131. Playford MP, Bicknell D, Bodmer WF, Macaulay VM. Insulin-like growth factor 1 regulates the location, stability, and transcriptional activity of beta-catenin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000 ; Oct 24;97(22):12103-8
132. Pollak MN, Schernhammer ES, Hankinson SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer.* 2004 ; Jul;4(7):505-18
133. Pollak MN. Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer.* 2004 ; 4:505-518
134. Poupon MF, Dissémination métastatique des cancers, p145, *Cancérologie fondamentale*, Ed John Libbey, 2005
135. Pupa SM, Ménard S, Forti S, Tagliabue E. New insights into the role of extracellular matrix during tumor onset and progression. *J Cell Physiol.* 2002 Sep;192(3):259-67.
136. Qiang YW, Yao L, G Tosato, Rudikoff S. Insulin-like growth factor I induces migration and invasion of human multiple myeloma cells. *Blood.* 2004 ; Jan 1;103(1):301-8
137. Rafii A, Mirshahi P, Poupot M, Faussat AM, Simon A et al. Oncologic trogocytosis of an original stromal cells induces chemoresistance of ovarian tumours. *PLoS One.* 2008 ; 3(12):e3894
138. Raman D, Baugher PJ, Thu YM, Richmond A. Role of chemokines in tumor growth. *Cancer Lett.* 2007 Oct 28;256(2):137-65. Epub 2007 Jul 12. Review.
139. Ramos-Nino ME et Littenberg B.. A novel combination: ranpirnase and rosiglitazone induce a synergistic apoptotic effect by down-regulating Fra-1 and Survivin in cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 2008 ; Jul;7(7):1871-9
140. Rantala JK, Pouwels J, Pellinen T, Veltel S, Laasola P, et al. SHARPIN is an endogenous inhibitor of  $\alpha 1$ -integrin activation. *Nat Cell Biol.* 2011 ; Sep 25;13(11):1315-24

141. Remacle-Bonnet MM, Garrouste FL, Heller S, Andre F, Marvaldi JL, et al. Insulin-like growth factor-I protects colon cancer cells from death factor-induced apoptosis by potentiating tumor necrosis factor alpha-induced mitogen-activated protein kinase and nuclear factor kappaB signaling pathways. *Cancer Research*. 2000 ; 60 2007–2017
142. Ribatti D, Mangialardi G, Vacca A. Stephen Paget and the ‘seed and soil’ theory of metastatic dissemination. *Clin Exp Med* 2006 ; 6: 145–9
143. Rubio I et Wetzker R. A permissive function of phosphoinositide 3-kinase in Ras activation mediated by inhibition of GTPase-activating proteins. *Curr Biol*. 2000 ; Oct 5;10(19):1225-8
144. Sachdev D, Yee D. Disrupting insulin-like growth factor signaling as a potential cancertherapy. *Mol Cancer Ther*. 2007;6:1-12.
145. Sakaguchi S. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 2000 May 26;101(5):455-8
146. Sako A, Kitayama J, Yamaguchi H, Kaisaki S, Suzuki H, et al. Vascular endothelial growth factor synthesis by human omental mesothelial cells is augmented by fibroblast growth factor-2: possible role of mesothelial cell on the development of peritoneal metastasis. *J Surg Res*. 2003 ; Nov;115(1):113-20
147. Samani AA, Yakar S, Le Roith D, Brodt P. The role of the IGF system in cancer growth and metastasis: overview and recent insights. *Endocr Rev*. 2007 ; Feb;28(1):20-47
148. Sato T, Sakai T, Noguchi Y, Takita M, Hirakawa S, et al. Tumor-stromal cell contact promotes invasion of human uterine cervical carcinoma cells by augmenting the expression and activation of stromal matrix metalloproteinases. *Gynecol Oncol*. 2004 ; Jan;92(1):47-56
149. Savage ND, Boer T, Walburg KV, et al. Human anti-inflammatory macrophages induce Foxp3+ GITR+ CD25+ regulatory T cells, which suppress via membrane-bound TGFbeta-1. *J Immunol*. 2008; 181 (3):2220–2226.
150. Scharf JG, Dombrowski F, Ramadori G. The IGF axis and hepatocarcinogenesis. *Mol Pathol*. 2001 Jun;54(3):138-44.
151. Schönwasser DC, Marais RM, Marshall CJ, Parker PJ. Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol*. 1998 ; Feb;18(2):790-8

152. Schultz, G.S., and Wysocki, A. Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 2009 ; 17, 153-162
153. Shain KH, Landowski TH, Dalton WS. Adhesion-mediated intracellular redistribution of c-Fas-associated death domain-like IL-1-converting enzyme-like inhibitory protein-long confers resistance to CD95-induced apoptosis in hematopoietic cancer cell lines. J Immunol. 2002 ; 168:2544–2553
154. Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. The final steps of integrin activation: the end game. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 ; Apr;11(4):288-300
155. Shigematsu S, Yamauchi K, Nakajima K, Iijima S, Aizawa T, et al. IGF-1 regulates migration and angiogenesis of human endothelial cells. Endocr J. 1999 ; Mar;46 Suppl:S59-62.
156. Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. Semin Cell Dev Biol. 2010 Feb;21(1):19-25
157. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. Nature. 1992 Oct 29;359(6398):843-5
158. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. Eur J Cancer. 2006 ; Apr;42(6):717-27
159. Sica A, Bronte V. Altered macrophage differentiation and immune dysfunction in tumor development. J Clin Invest. 2007;117(5):1155–1166.
160. Sjölander A, Yamamoto K, Huber BE, Lapetina EG. Association of p21ras with phosphatidylinositol 3-kinase. Proc Natl Acad Sci USA. 1991 ; Sep 15;88(18):7908-12
161. Steward RL, Cheng CM, Ye JD, RM Bellin, Leduc PR. Mechanical stretch and shear flow induced reorganization and recruitment of fibronectin in fibroblasts. Sci Rep. 2011 ; 1:147
162. Sundelacruz S et Kaplan DL. Stem cell-and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. Sem Cell Dev Biol. 2009 ; 20: 646-655
163. Tammela T, Saaristo A, Lohela M, Morisada T, Tornberg J, et al. Angiopoietin-1 promotes lymphatic sprouting and hyperplasia. Blood. 2005 ; 105 (12):4642–4648
164. Tanaka R, Saito T, Ashihara K, Nishimura M, Mizumoto H, et al. Three-dimensional coculture of endometrial cancer cells and fibroblasts in human placenta derived collagen

- sponges and expression matrix metalloproteinases in these cells. *Gynecol Oncol.* 2003 ; Aug;90(2):297-304
165. Tao Y, Pinzi V, Bourhis J, Deutsch E. Mechanisms of Disease: signaling of the insulin-like growth factor 1 receptor pathway - therapeutic perspectives in cancer. *Nat Clin Prac Oncol.* 2007 ; 4:591-602
  166. Thomas H et Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. *Cancer Control.* 2003 ; 10:159–165
  167. Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role for epithelial-mesenchymal transition? *Cancer Res.* 2005 ; Jul 15;65(14):5991-5
  168. Thrailkill KM, Quarles LD, Nagase H, Suzuki K, Serra DM, et al. Characterization of insulin-like growth factor-binding protein 5-degrading proteases produced throughout murine osteoblast differentiation. *Endocrinology.* 1995 ; Aug;136(8):3527-33
  169. Toretsky JA, Helman LJ. Involvement of IGF-II in human cancer. *J Endocrinol.* 1996 ; 149:367-372
  170. Turner HE, Harris AL, Melmed S, Wass JA. Angiogenesis in endocrine tumors. *Endocr Rev.* 2003 ; Oct;24(5):600-32
  171. Tucker GC. Integrins: molecular targets in cancer therapy. *Curr Oncol Rep.* 2006 Mar;8(2):96-103.
  172. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2008 ; 8: 726-736
  173. Ulrich Hermanto, Cong S. Zong, Weiqun Li, Lu-Hai Wang. RACK1, an Insulin-Like Growth Factor I (IGF-I) Receptor-Interacting Protein, Modulates IGF-I-Dependent Integrin Signaling and Promotes Cell Spreading and Contact with Extracellular Matrix. *Mol Cell Biol.* 2002 ; Apr;22(7):2345-65
  174. González A, López B, Díez J. Fibrosis in hypertensive heart disease: role of the renin-angiotensin-aldosterone system. *Med Clin North Am.* 2004 ; Jan;88(1):83-97
  175. Ungefroren H, Sebens S, Seidl D, Lehnert H, Hass R. Interaction of tumor cells with the microenvironment. *Cell Commun Signal.* 2011 ; Sep 13;9:18
  176. Vakonakis, I. & Campbell, I. D. Extracellular matrix : from atomic resolution to ultrastructure. *Curr Opin Cell Biol.* 2007 ; 19, 578-83

177. Valable S, Barbier EL, Bernaudin M, Roussel S, Segebarth C, et al. In vivo MRI tracking of exogenous monocytes/macrophages targeting brain tumors in a rat model of glioma. *Neuroimage*. 2007 ; 37(Suppl 1):S47–S58
178. Vatten LJ, Nilsen ST, Odegård RA, Romundstad PR, Austgulen R. Insulin-like growth factor I and leptin in umbilical cord plasma and infant birth size at term. *Pediatrics*. 2002 Jun;109(6):1131-5.
179. Vogler M, Butterworth M, Majid A, Walewska RJ, Sun XM, et al. Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2009 ; 113:4403–4413
180. Vorwerk P, Hohmann B, Oh Y, Rosenfeld RG, Shymko RM, et al. Binding properties of insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3), IGFBP-3 N- and C-terminal fragments, and structurally related proteins mac25 and connective tissue growth factor measured using a biosensor. *Endocrinology*. 2002 ; May;143(5):1677-85
181. Vu, T.H. MMP-9/gelatinase B is a key regulator of growth plate angiogenesis and apoptosis of hypertrophic chondrocytes. *Cell*. 1998 ; May 1;93(3):411-22
182. Wallach D, Kang TB, Kovalenko A. The extrinsic cell death pathway and the élan mortel. *Cell Death Differ*. 2008 ; Oct;15(10):1533-41
183. Wang D, Wang H, Brown J, et al. CXCL1 induced by prostaglandin E2 promotes angiogenesis in colorectal cancer. *J Exp Med*. 2006 ; 203(4):941–951
184. Warren RS, Yuan H, Matli MR, Ferrara N, Donner DB. Induction of vascular endothelial growth factor by insulin-like growth factor 1 in colorectal carcinoma. *J Biol Chem*. 1996 ; Nov 15;271(46):29483-8
185. Weinberg JM. Most recent prevention strategies. *Rev Recent Clin Trials*. 2007 ; Jan;2(1):1
186. Werner H, LeRoith D. The role of the insulin-like growth factor system in human cancer. *Adv Cancer Res*. 1996 ; 68:183-223
187. Wilson AP. Mesothelial cells stimulate the anchorage-independent growth of human ovarian tumour cells. *Br J Cancer*. 1989 ; Jun;59(6):876-82
188. Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J Exp Clin Cancer Res*. 2011 ; Sep 26;30:87

189. Wu KD, Zhou L, Burtrum D, Ludwig DL, Moore MA. Antibody targeting of the insulinlike growth factor I receptor enhances the anti-tumor response of multiple myeloma to chemotherapy through inhibition of tumor proliferation and angiogenesis. *Cancer Immunol Immunother.* 2007;56:343-357
190. Wu J, Zhu AX Targeting insulin-like growth factor axis in hepatocellular carcinoma. *J Hematol Oncol.* 2011 Jul 5;4:30.
191. Wu MS, Wang HP, Lin CC, Sheu JC, Shun CT, et al. Loss of imprinting and overexpression of IGF2 gene in gastric adenocarcinoma. *Cancer Lett.* 1997 ; Nov 25;120(1):9-14
192. Wu Y, Cui K, Miyoshi K, Hennighausen L, Green JE, et al. Reduced circulating insulin-like growth factor I levels delay the onset of chemically and genetically induced mammary tumors. *Cancer Res.* 2003 ; 63:4384-4388
193. Wu Y, Yakar S, Zhao L, Hennighausen L, LeRoith D. Circulating insulin-like growth factor-I levels regulate colon cancer growth and metastasis. *Cancer Res.* 2002 ; Feb 15;62(4):1030-5
194. Xu J, Rodriguez D, Petitclerc E, Kim JJ, Hangai M, Moon YS, et al. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. *J Cell Biol.* 2001 ; Sep 3;154(5):1069-79
195. Yakar S, Liu JL, Stannard B, Butler A, Accili D, Sauer B, LeRoith D. Normal growth and development in the absence of hepatic insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jun 22;96(13):7324-9.
196. Yakirevich E, Sabo E, Naroditsky I, Sova Y, Lavie O, et al. Multidrug resistance-related phenotype and apoptosis-related protein expression in ovarian serous carcinomas. *Gynecol Oncol.* 2006 ; Jan;100(1):152-9
197. Yang SY, Winslet M. The igf system in carcinogenesis and its implication for cancer therapy. *Curr Oncol.* 2011 ; Dec;18(6):301-2
198. Yballe CM, Vu TH, Hoffman AR. Imprinting and expression of insulin-like growth factor-II and H19 in normal breast tissue and breast tumor. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996 ; Apr;81(4):1607-12
199. Yu et Rohan. Role of the insulin-like growth factor family in cancer development and progression. *J Natl Cancer Inst.* 2000 ; Sep 20;92(18):1472-89

200. Zelzer E, Levy Y, Kahana C, Shilo BZ, Rubinstein M, et al. Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1 $\alpha$ /ARNT. *EMBO J.* 1998 ; Sep 1;17(17):5085-94
201. Zhang D, Bar-Eli M, S Meloche, Brodt P. Dual regulation of MMP-2 expression by the type 1 insulin-like growth factor receptor: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Raf/ERK pathways transmit opposing signals. *J Biol Chem.* 2004 ; May 7;279(19):19683-903-90
202. Zhang S, Wang J, Bilen MA, Lin SH, Stupp SI, et al. Modulation of prostate cancer cell gene expression by cell-to-cell contact with bone marrow stromal cells or osteoblasts. *Clin Exp Metastasis.* 2009 ; 26(8):993-1004
203. Zhang XY, Pettengell R, Nasiri N, Kalia V, Dalglish AG, et al. Characteristics and growth patterns of human peritoneal mesothelial cells: comparison between advanced epithelial ovarian cancer and non-ovarian cancer sources. *J Soc Gynecol Investig.* 1999 ; Nov-Dec;6(6):333-40
204. Zucker S, Lysik RM, Zarrabi MH, Moll U. M(r) 92,000 type IV collagenase is increased in plasma of patients with colon cancer and breast cancer. *Cancer Res.* 1993 ; Jan 1;53(1):140-6



## **ANNEXES**

**Les travaux en collaboration ont abouti à la réalisation de deux articles en co-auteurs :**

- Insulin Growth Factor Promotes Human Corneal Fibroblast Network Formation *In Vitro*
- Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1) expression in human corneal fibroblast decreased with age